



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

# **Modulación de la respuesta inmune en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) frente a distintas estrategias vacunales antivirales.**



**TESIS DOCTORAL**

**Susana Martínez Alonso**

**Madrid 2012**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**Modulación de la respuesta inmune en  
trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)  
frente a distintas estrategias vacunales  
antivirales**

Memoria presentada por Susana Martínez Alonso para optar al grado de  
Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 2012

El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) bajo la dirección de la Dra. Carolina Tafalla Piñeiro y ha sido financiado por fondos públicos a través del proyecto AGL2008-03519-C04-02 del Plan Nacional de I+D (Ministerio de Ciencia e Innovación respectivamente), así como la red europea de excelencia EPIZONE.

Madrid, 19 de Abril de 2012



Fdo. Carolina Tafalla Piñeiro

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería dar las gracias a mi directora de tesis Carolina Tafalla por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en su equipo, por sus consejos y su excelente dirección.

Gracias a Torsten Snogdal, Niels Lorenzen, Ellen Lorenzen, Niels Jørgen Olesen y Katja Einer-Jensen, del DTU National Veterinary Institute de Åarhus, que me dedicaron su atención durante mi estancia en Dinamarca para realizar los experimentos relacionados con el desarrollo de la vacuna oral. Gracias por su colaboración y por su ayuda.

También quería dar las gracias a Sara Isabel Pérez Prieto y Sylvia Rodríguez Saint-Jean, del CIB-CSIC, por su ayuda con la encapsulación de los plásmidos vacunales, así como a Luis Guaita y Mercedes Sánchez. Gracias por vuestra colaboración en este experimento, por los consejos y por la calidez recibida en el laboratorio.

Gracias a José María Nieto, Toñi González e Isabel Casanova, profesionales del CISA, por su ayuda con los estudios histológicos relacionados con esta tesis.

Gracias también a Amparo Estepa, de la Universidad Miguel Hernández, por su ayuda con las neutralizaciones en el experimento del análisis de la inmunogenicidad de vacunas con motivos CpG.

Quería agradecer a Vikram Vakharia, de la Universidad de Maryland, que nos haya prestado las VLPs de IPNV.

Gracias a los compañeros del laboratorio que me ayudaron en los experimentos, sobre todo en mis primeros pasos en el grupo. Gracias a Lucía, Alberto, Camino y especialmente a Jana. Hay una parte tuya en cada una de mis Real time.

Y gracias a Nacho Mena por darme a conocer el CISA y enseñarme todo lo posible mientras estuve bajo su dirección el primer año en el centro.

Muchísimas gracias a Eva, Teresa y Jana (de nuevo) por haber compartido conmigo el día a día en el CISA. Por vuestra amistad. Me siento realmente afortunada de haberme encontrado con vosotras. Gracias chicas.

Gracias Juanes, por haberme acompañado y apoyado en el último tramo en el CISA, en Dinamarca y en todo el transcurso de la escritura de la tesis. Gracias por estar a mi lado cada día. Quiero que sepas que me siento feliz.

Quería dedicar esta tesis a mi madre y a mi hermano. Os quiero, ¿qué más puedo decir? Sin vosotros todo estaría oscuro, gracias por iluminarme. No puedo creer la suerte que tengo de tener una familia tan maravillosa.

Por último, quería agradecer a mi padre todo lo que me enseñó en su tiempo aquí. Siempre estarás en mi corazón.

## **Abreviaturas y unidades**

**°C** Grados centígrados

**ADN** Ácido deoxirribonucleico

**ADNc** Ácido deoxirribonucleico complementario

**ARN** Ácido ribonucleico

**ARNm** Ácido ribonucleico mensajero

**BSA** Albúmina de suero bovino

**CMSV** Virus del síndrome de la cardiopatía

**CMV** Citomegalovirus

**CSF** Factor de estimulación de colonias

**DEPC** Dietilpirocarbonato

**DNA<sub>sa</sub>** Deoxirribonucleasa

**dNTP** Deoxinucleótidos trifosfato

**DO** Densidad óptica

**DTT** Ditioneitol

**EF-1  $\alpha$**  Factor de elongación 1 $\alpha$

**ELISA** Ensayo inmunoenzimático

**FAO** Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación

**FCS** Suero fetal bovino

**g** Gramo

**ng** Nanogramos

**$\mu$ g** Microgramo

**IFN** Interferón

**h** Hora

**Ig** Inmunoglobulina

**IHNV** Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa

**IL** Interleuquina

**IPNV** Virus de la necrosis pancreática infecciosa

**ISAV** Virus de la anemia infecciosa del salmón

**kDa** Kilodalton

**L-15** Medio Leibovitz 15

**LPS** Lipopolisacárido bacteriano

**MAF** Factor activador de macrófagos

**MEM** “Minimal Essential Medium”

**MHC** Complejo mayor de histocompatibilidad

**min** Minuto

**NBT** Azul de tetrazolio nitrado

**M** Molar

**ml** Mililitros

**μl** Microlitros

**nm** Nanometro

**ODN** Oligodeoxinucleótidos

**OIE** Organización Mundial de Sanidad Animal

**pb** Pares de bases

**PBS** Tampón fosfato salino

**PBT** Tampón fosfato salino con albúmina de suero bovino

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**RDRP** ARN polimerasa dependiente de ARN

**PDV** Virus de la enfermedad del páncreas

**p.f.u.** Unidades formadoras de placa

**rpm** Revoluciones por minuto

**s** Segundo

**SVCV** Virus de la septicemia primaveral de la carpa

**TCID<sub>50</sub>** Dosis infectiva citotóxica al 50%

**TGF** Factor de crecimiento transformante

**TNF** Factor de necrosis tumoral

**VHSV** Virus de la septicemia hemorrágica viral

**VLPs** Cápsidas vacías de virus/ “virus like particles”

**VNN** Necrosis nerviosa vírica

**UE** Unión europea

### **Términos científicos en inglés no traducidos**

**Primer** Oligonucleótido complementario a una determinada secuencia de ADN utilizado en PCR

**Stock** Muestra de abastecimiento o reserva





# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN EN INGLÉS .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
1. IMPORTANCIA ACTUAL DE LA ACUICULTURA .....	7
2. PRINCIPALES ENFERMEDADES VÍRICAS EN ACUICULTURA .....	7
2.1. Rabdovirus .....	8
2.1.1. La septicemia hemorrágica viral (VHS).....	10
2.1.2. La necrosis hematopoyética infecciosa (IHN) .....	12
2.2. Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV).....	12
2.3. Otros virus que afectan a salmónidos .....	15
2.3.1. Virus de la enfermedad del páncreas (PDV) .....	15
2.3.2. Virus de la enfermedad de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) .....	15
2.3.3. Virus del síndrome de la cardiomiopatía (CMSV) .....	16
2.3.4. Nodavirus .....	16
3. ORGANIZACIÓN GENERAL DEL SISTEMA INMUNE DE LOS PECES .....	17
4. VACUNAS FRENTE A ENFERMEDADES VIRALES EN PECES .....	20
4.1. Tipos de vacunas .....	20
4.2. Vacunas experimentales frente a <i>Novirhabdovirus</i> .....	22
4.3. Vacunas experimentales frente a IPNV .....	24
4.4. Adyuvantes en vacunación .....	25
4.5. Métodos de administración alternativos .....	28
<b>III. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
1. LÍNEAS CELULARES Y VIRUS UTILIZADOS .....	39
1.1. Líneas celulares estables .....	39
1.2. Producción de stocks virales .....	39
1.3. Titulaciones virales .....	39

2. VACUNAS FRENTE A VHSV, IHNV E IPNV .....	40
2.1. Vacunas ADN frente a rabdovirus (VHSV, IHNV) .....	40
2.2. Propagación de plásmidos por clonación .....	40
2.3. Cápsidas virales vacías (VLPs) de IPNV .....	41
2.4. Introducción de motivos CpG en la vacuna ADN frente a VHSV .....	41
2.5. Encapsulación de vacunas ADN en alginatos .....	42
3. PROTOCOLOS DE INMUNIZACIÓN .....	44
3.1. Peces .....	44
3.2. Administración intramuscular de vacunas ADN .....	44
3.3. Administración oral de vacunas ADN .....	45
3.4. Administración intraperitoneal de VLPs de IPNV .....	46
4. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR VACUNAS .....	47
4.1 Transcripción de genes inmunes .....	47
4.1.1. Aislamiento de ARN .....	47
4.1.2. Eliminación del ADN genómico contaminante .....	48
4.1.3. Producción de ADNc .....	48
4.1.4. PCR a tiempo real .....	48
4.2. Actividad neutralizante del suero .....	50
4.3. Proliferación linfocitaria .....	52
4.3.1. Aislamiento de leucocitos de sangre periférica .....	52
4.3.2. Proliferación linfocitaria .....	52
4.4. Obtención de células peritoneales .....	52
4.5. Inmunohistoquímica .....	53
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	54
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
1. AUMENTO DE LA INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA ADN MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE MOTIVOS CpG .....	57
1.1. Producción de vacunas ADN frente a VHSV mediante la incorporación de motivos CpG .....	57

1.2. Niveles de transcripción de genes inmunes en músculo .....	57
1.3. Niveles de transcripción de genes inmunes en bazo .....	64
1.4. Producción de anticuerpos neutralizantes en respuesta a las distintas vacunas .....	69
 2. INDUCCIÓN DE QUIMIOQUINAS EN MÚSCULO EN RESPUESTA A DISTINTAS VACUNAS ADN .....	 70
2.1. Infiltración en músculo en respuesta a vacunación ADN .....	70
2.2. Niveles de transcripción de quimioquinas en músculo en respuesta a la vacunación ADN .....	 72
 3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL TRAS LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE VACUNAS ADN.....	 85
3.1. Encapsulación de la vacuna ADN en alginatos .....	85
3.2. Expresión de la vacuna en el intestino .....	85
3.3. Niveles de transcripción de genes inmunes en la mucosa intestinal .....	88
3.4. Producción de anticuerpos neutralizantes .....	93
3.5. Protección frente al desafío .....	93
 4. RESPUESTA INMUNE DESATADA POR LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERITONEAL DE VLPS DE IPNV .....	 95
4.1. Efectos sobre la transcripción de quimioquinas en bazo .....	95
4.2. Efectos sobre la transcripción de genes relacionados con el IFN en bazo .....	97
4.3. Caracterización de células movilizadas a peritoneo .....	98
4.4. Transcripción de quimioquinas de las células movilizadas a peritoneo .....	100
4.5. Producción de anticuerpos neutralizantes .....	101
4.6. Proliferación inespecífica .....	102
 <b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	 103
1. VACUNAS ADN FRENTE A RABDOVIRUS .....	106
1.1. Aumento de la inmunogenicidad por medio de la incorporación de motivos CpG ....	106
1.2. Infiltración celular en la zona de expresión del antígeno .....	110
1.3. Administración oral de las vacunas ADN .....	112
 2. VLPs FRENTE A IPNV .....	 116

<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>121</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>125</b>
<b>IX. ANEXO .....</b>	<b>143</b>
1. PUBLICACIONES .....	145
2. COMUNICACIONES A CONGRESOS .....	145

# ÍNDICE DE FIGURAS

## INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b> Organización del genoma de VHSV .....	9
<b>Figura 2.</b> Esquema de la estructura de los rabdovirus .....	9
<b>Figura 3.</b> Signos clínicos de la enfermedad provocada por VHSV en trucha arcoíris.....	11
<b>Figura 4.</b> Organización del genoma de IPNV .....	13
<b>Figura 5.</b> Esquema de la estructura de IPNV .....	14

## RESULTADOS

### 1. Aumento de la inmunogenicidad de una vacuna ADN mediante la incorporación de motivos CpG

<b>Figura 6.</b> Transcripción de Mx en el músculo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.....	59
<b>Figura 7.</b> Transcripción de IFN- $\gamma$ en el músculo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivosCpG.....	60
<b>Figura 8.</b> Transcripción de MHC-I en el músculo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.....	61
<b>Figura 9.</b> Transcripción de IL-1 $\beta$ en el músculo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.....	62
<b>Figura 10.</b> Transcripción de TLR-9 en el músculo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.....	63
<b>Figura 11.</b> Transcripción de Mx en el bazo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.....	64
<b>Figura 12.</b> Transcripción de IFN- $\gamma$ en el bazo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.....	65
<b>Figura 13.</b> Transcripción de MHC-I en el bazo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.....	66
<b>Figura 14.</b> Transcripción de IL-1 $\beta$ en el bazo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.....	67
<b>Figura 15.</b> Transcripción de TLR-9 en el bazo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.....	68

<b>Figura 16.</b> Actividad neutralizante de los sueros de peces vacunados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.....	69
---	----

## 2. Inducción de quimioquinas en músculo en respuesta a distintas vacunas ADN

<b>Figura 17.</b> Inmunohistoquímica de músculo de trucha arcoíris vacunada con pVHSV utilizando anticuerpos monoclonales específicos anti-IgM y anti-IgT de trucha.....	71
<b>Figura 18.</b> Niveles de transcripción de IgM, IgT, CD4 y CD8 en músculo después de la vacunación ADN.....	72
<b>Figura 19.</b> Niveles constitutivos de transcripción de todas las quimioquinas estudiadas en el músculo de truchas sin tratar.....	73
<b>Figura 20.</b> Niveles de transcripción de CK3 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.....	74
<b>Figura 21.</b> Niveles de transcripción de CK5B en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.....	75
<b>Figura 22.</b> Niveles de transcripción de CK6 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.....	76
<b>Figura 23.</b> Niveles de transcripción de CK9 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.....	77
<b>Figura 24.</b> Niveles de transcripción de CK10 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.....	78
<b>Figura 25.</b> Niveles de transcripción de CK11 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.....	79
<b>Figura 26.</b> Niveles de transcripción de CK12 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.....	80
<b>Figura 27.</b> Niveles de transcripción de CXCL10 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.....	81
<b>Figura 28.</b> Niveles de transcripción de CXCL10 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.....	82
<b>Figura 29.</b> Niveles de transcripción de IL-8 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.....	83

### **3. Evaluación de la respuesta inmune local tras la administración oral de vacunas ADN**

<b>Figura 30.</b> Evidencia de la vacuna pVHSV dentro de las cápsulas de alginatos por PCR y visualización en gel teñido con bromuro de etidio.....	86
<b>Figura 31.</b> Expresión de la vacuna en los diferentes fragmentos del tracto intestinal de los peces vacunados oralmente.....	86
<b>Figura 32.</b> Inmunohistoquímica de los distintos segmentos del intestino de animales vacunados oralmente con pVHSV para la detección de la proteína G de VHSV.....	87
<b>Figura 33.</b> Transcripción de Mx en el intestino posterior tras la vacunación oral.....	89
<b>Figura 34.</b> Transcripción de IgT en el intestino posterior tras la vacunación oral.....	90
<b>Figura 35.</b> Transcripción de IgM en el intestino posterior tras la vacunación oral.....	91
<b>Figura 36.</b> Transcripción de CK12 en el intestino posterior tras la vacunación oral.....	92
<b>Figura 37.</b> Transcripción de CCR7 en el intestino posterior tras la vacunación oral.....	93
<b>Figura 38.</b> Mortalidad representada en porcentaje de todos los grupos vacunados y el control negativo en el desafío frente a VHSV representada a lo largo de 46 días.....	95

### **4. Respuesta inmune desatada por la administración intraperitoneal de VLPs de IPNV**

<b>Figura 39.</b> Expresión de genes de quimioquinas en el bazo en respuesta a la administración de VLPs.....	97
<b>Figura 40.</b> Expresión de genes relacionados con la respuesta a IFN en el bazo en respuesta a la administración de VLP.....	98
<b>Figura 41.</b> Expresión de genes codificantes para marcadores de poblaciones leucocitarias en células obtenidas de la cavidad peritoneal de peces inyectados con VLPs o IPNV vivo.....	99
<b>Figura 42.</b> Expresión de genes de quimioquinas de células obtenidas de la cavidad peritoneal de peces inyectados con VLPs o IPNV.....	100
<b>Figura 43.</b> Proliferación inespecífica de los leucocitos en sangre en respuesta a VLPs.....	102



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Primers específicos para detectar los genes que codifican la proteína G de VHSV e IHNV por medio de PCR en el interior de las microesferas de alginato.....	43
---	----

<b>Tabla 2.</b> Secuencias de los primers utilizados para llevar a cabo las PCRs a tiempo real de los distintos genes estudiados incluyendo sus correspondientes números de acceso en el GenBank.....	49
---	----

<b>Tabla 3.</b> Resumen de las diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes de quimioquinas observados en músculo en respuesta a los plásmidos vacunales respecto a los observados con el plásmido vacío.....	84
--	----

<b>Tabla 4.</b> Títulos de neutralización de IPNV obtenidos en los sueros obtenidos de truchas vacunadas con VLPs y los controles inyectados con PBS.....	101
---	-----

# **I. RESUMEN EN INGLÉS**



The aquaculture industry constitutes a very important animal-producing sector in the context of an increasing human population and a commercial fishing industry that is at or beyond its sustained yield. To achieve an optimal level of growth, the problem of fish infectious diseases in aquaculture must be urgently addressed. Viruses constitute one of the major threats for the aquaculture industry, and the great majority of fish diseases notifiable to the European Union (EU) or the world organization for animal health (OIE) are of viral nature. Among these notifiable diseases, two viruses of the family *Rhabdoviridae*: viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) both belonging to the genus *Novirhabdovirus* have the potential to severely impact the EU trout aquaculture. Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) within the *Birnaviridae* family is also one of the main causes of mortality for worldwide salmonid juveniles, being especially destructive in salmonid eggs and fingerlings, in which a lifelong asymptomatic carrier state can be established. However while the control of these viruses constitutes a major concern for the aquaculture industry, to date, no cost-effective vaccines are available for any of them worldwide.

Many previous efforts were made searching for efficient vaccines against rhabdoviruses with none or little success. In contrast, intramuscular administration of plasmid DNA encoding the viral glycoprotein proved to be highly effective against both VHSV and IHNV reaching protection levels of up to 95-100%. However, to date, different practical issues limit their commercialization in Europe such as concerns related to the viral regulatory sequences (promoters and terminators) present in plasmid constructs, relatively high vaccination costs and the lack of administration methods such as bath or oral delivery that require less manpower than injection. Moreover, not having identified the immune mechanisms responsible for protection strongly limits: the development of best possible vaccination strategies for other fish viruses; the development of new adjuvant and co-stimulation strategies and the development of *in vitro* immunoassays to predict vaccine efficacy.

Concerning DNA vaccines against fish rhabdoviruses, in this work, we have tried to address several of these problems. Through the introduction of immune-stimulatory CpG sequences in the vaccine constructs we have been able to increase the immunogenicity of the VHSV DNA vaccine. We have also studied the local immune response in the muscle of vaccinated fish from a point of view not previously approached, the transcription of chemokines and the characterization of the infiltrating cells. Finally, the possibility of

## RESUMEN EN INGLÉS

administering the DNA vaccines orally through encapsulation in alginate microspheres has also been evaluated, focusing on the mucosal immune responses triggered.

Moreover, virus like particles (VLPs) against viral pathogens not only constitute a novel approach for the development of antiviral vaccines for an specific virus, but also for the creation of multivalent vaccines in which antigens from other pathogens may be expressed on the surface of these VLPs. Despite positive results on protection, not many studies have focused on the immune response triggered by VLPs; studies that may provide hints for the identification of immune mechanisms responsible for antiviral protection, which are mostly unknown in fish. Thus, in the current work, we have also studied some aspects of the immune response triggered by them.

All these immunological studies performed with different antiviral vaccines in fish should contribute to a further understanding of the immune responses responsible for protection against viruses in fish, an essential point for a future rational design of antiviral vaccines.

## II. INTRODUCCIÓN



### 1. Importancia actual de la acuicultura

Debido a la gran explotación sufrida en el medio natural a causa de la pesca intensiva (tanto continental como marina), la producción mundial de pescado procedente de la acuicultura ha crecido substancialmente en la última década, alcanzando 52,5 millones de toneladas en 2008, comparado con los 32,4 millones de toneladas en 2000. La acuicultura continúa siendo el sector alimentario de más rápido crecimiento y aporta actualmente casi la mitad (45,6 por ciento) del pescado para consumo en el mundo, comparado con el 33,8 por ciento en 2000, según el último informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) titulado “Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura, 2010”.

Con el estancamiento de la pesca de captura global y una población humana en aumento, la acuicultura se percibe como el sector con mayor potencial para producir más pescado en el futuro y así atender a la demanda creciente de alimentos acuáticos sanos y de calidad. Según la FAO, se estima que para 2012 más del 50 por ciento del consumo global de alimentos acuáticos provendrá de la acuicultura (FAO, 2010).

Europa destaca a nivel mundial por la cría de peces y moluscos de alto valor comercial. Entre las especies producidas destacan el salmón atlántico (*Salmo salar*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), la carpa (*Cyprinus carpio*) o el mejillón (*Mytilus galliprovincialis*). En el caso de España, las principales especies producidas son el mejillón, seguido muy de cerca por la dorada y lubina, especies marinas que han visto incrementada su producción en los últimos años, y la trucha arcoíris que en el caso de los cultivos continentales constituye un 96,5 % de la producción total.

### 2. Principales enfermedades víricas en acuicultura

En las piscifactorías, como consecuencia de la producción intensiva, aparecen frecuentemente enfermedades y patologías que causan graves pérdidas económicas. Las condiciones de alta densidad en las que se encuentran los peces provocan situaciones de estrés generalizado que favorecen el impacto y la propagación de las enfermedades infecciosas y el aumento de los contagios.



## INTRODUCCIÓN

Las patologías que afectan a los peces pueden ser de origen bacteriano, parasitario o vírico, siendo estas últimas las que provocan mayores mortalidades debido en parte a la falta de tratamientos, tales como los antibióticos en el caso de las bacterias, o de vacunas eficaces. Debido a esto, la mayoría de las enfermedades de peces de declaración obligatoria por la Unión Europea (UE), así como las englobadas en la antigua lista A de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), son en su mayoría de origen vírico.

### 2.1. Rabdovirus

El grupo más numeroso de virus que afecta a peces, se encuentra dentro de la familia *Rhabdoviridae* produciendo altas mortalidades entre peces de gran valor comercial (Coll, 1991). Entre los rabdovirus, los dos virus con mayor incidencia en la acuicultura a nivel mundial son el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV), ambos pertenecientes al género *Novirhabdovirus*. Estos dos virus, dada la importancia de las pérdidas económicas que provocan, son de declaración obligatoria para la OIE y la UE. Aunque no esté dentro de los virus de declaración obligatoria, debido a que se considera endémico en Europa, el virus de la septicemia primaveral de la carpa (SVCV) constituye también un grave problema para el cultivo de carpa, provocando altas mortalidades. Este virus, aunque es también un rabdovirus, pertenece al género *Vesiculovirus*.

Los rabdovirus poseen forma de bala, envuelta lipídica y su material genético es ARN de cadena sencilla de polaridad negativa. Los *Novirhabdovirus* tienen un genoma de unas 11.137-11.158 bases (Morzunov *et al.*, 1995; Schuetze *et al.*, 1999) y entre ellos, se ha secuenciado el genoma completo de distintas cepas tanto de VHSV (Nishizawa *et al.*, 2002; Schutze *et al.*, 1999) como de IHNV (Morzunov *et al.*, 1995). Su genoma codifica para cinco proteínas: la ARN polimerasa (proteína L), dos proteínas de matriz (la M y una fosfoproteína (P) que está asociada a la polimerasa L), una nucleoproteína (N) y una glicoproteína (proteína G). En el caso de los *Novirhabdovirus* tales como VHSV e IHNV existe además una proteína no estructural Nv, de menor peso molecular, no descrita en otros rabdovirus y con función desconocida, que da nombre al género al que pertenecen (“Novi” son las siglas de Non-Virion gene) (Schutze *et al.*, 1996) (**Figura 1**).



Figura 1. Organización del genoma de VHSV

Dentro de sus proteínas estructurales, la proteína G (72-80 kDa) es la más estudiada. La G es una glicoproteína que forma las espículas triméricas en la membrana del virus siendo responsable de la unión del virus a su(s) receptor(es) celular(es) y la única capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en el hospedador (**Figura 2**). La nucleoproteína N (38-42 kDa) forma la nucleocápsida y es la proteína mayoritaria del virus.

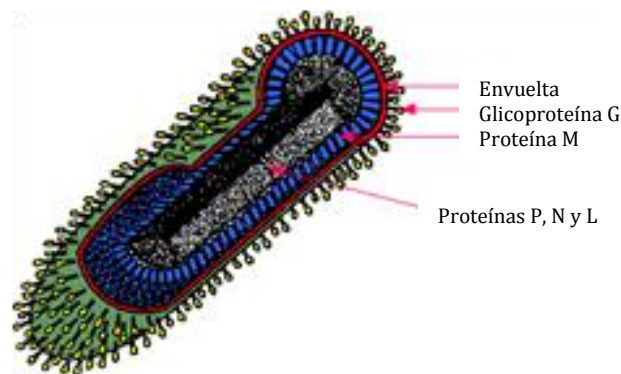


Figura 2. Esquema de la estructura de los rabdovirus

En la infección, se sabe que los rabdovirus se adsorben a la membrana celular penetrando en la célula por endocitosis mediada por receptor a través de la proteína G del virus (Bearzotti *et al.*, 1999; Schlegel *et al.*, 1983). La fusión de la membrana viral y la del endosoma es dependiente de pH, y tras la fusión, la nucleocápsida libera el ARN en el citoplasma celular. La replicación tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas y los viriones maduran y brotan por gemación de la superficie celular llegando a lisar la célula.

## INTRODUCCIÓN

### 2.1.1. La septicemia hemorrágica viral (VHS)

La septicemia hemorrágica viral (VHS) causada por el virus del mismo nombre o virus de Egtved, se describió por primera vez en Dinamarca en 1938, aunque el agente etiológico causante no fue aislado hasta 1965 (Jensen, 1965). La principal especie susceptible es la trucha arcoíris, pero también afecta a otros salmónidos como la trucha común (*Salmo trutta*), el salmón atlántico (*Salmo salar*) o el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*). Sin embargo hay que señalar que hay otras muchas especies de peces no salmónidos tanto de agua dulce como marina que han sufrido brotes de la enfermedad generalmente con importantes mortalidades. Dentro de estas especies, se encuentran peces cultivados de alto valor comercial tales como el rodaballo (Schlotfeldt *et al.*, 1991).

Existen cuatro genotipos de VHSV con diferente virulencia para las distintas especies de peces. Los aislados virulentos de agua dulce pertenecen a los genotipos Ia y IV, mientras que la mayoría de los aislados marinos se agrupan en los genotipos Ib o III. Las cepas marinas se han referenciado ampliamente en especies marinas salvajes en Europa del Norte, pero también en Francia, Italia y España, y constituyen una gran amenaza para las especies cultivadas en agua marina, incluyendo a la trucha arcoíris criada en agua marina, en cuyas granjas han sido declarados varios brotes (Dale *et al.*, 2009; Raja-Halli *et al.*, 2006). La legislación actual en la que todos los genotipos VHSV son de declaración obligatoria en la UE obliga a los acuicultores a erradicar VHSV si se detecta, independientemente de cuál sea el genotipo y a pesar de la presencia de un reservorio marino de VHSV. Todo esto protege la industria de la trucha arcoíris pero limita enormemente el desarrollo de una industria de acuicultura para otras especies marinas susceptibles, tales como el rodaballo. Por todo ello, es muy importante seguir estudiando la respuesta inmune frente a VHSV así como la vacunación en estas especies para las cuales este virus es el principal obstáculo para la consolidación de una industria de producción sólida en la UE.

En España se han declarado brotes de VHSV en el pasado, sobre todo en salmónidos cultivados, provocando mortalidades de hasta el 80% (Basurco y Coll, 1989; Basurco y Coll, 1992). Aunque actualmente se considera erradicado, sólo algunas cuencas y regiones españolas están oficialmente libres de VHSV, por lo que este virus continúa siendo un tema de importancia para la acuicultura española que depende en gran medida de la importación de alevines de Europa donde el virus si está presente. Asimismo, también cerca

de nuestras costas se han declarado en ocasiones aislados marinos de baja virulencia que podrían llegar a provocar problemas en especies cultivadas.

La fase aguda de la enfermedad provocada por VHSV se presenta durante las primeras etapas de la infección (hasta 30 días). En esta etapa los signos clínicos son letargo, oscurecimiento de la piel, exoftalmia, forma anormal de nadar, branquias pálidas, y hemorragias en la piel, en la base de las aletas, en las branquias y en los ojos, etc, tal como se muestra en la **Figura 3**. La mortalidad se produce rápidamente pudiendo alcanzar el 100% en alevines. La enfermedad puede cursar una fase subaguda crónica en la que los peces afectados no muestran signos externos. El virus VHSV tiene tropismo por el cerebro, lo que puede derivar en una forma de nadar anormal, intermitente o en espiral de los peces. No existe por el momento ningún tratamiento autorizado ni ninguna vacuna disponible para el control de VHSV.



**Figura 3. Signos clínicos de la enfermedad provocada por VHSV en trucha arcoíris.** Comparación de una trucha sana (arriba) y una trucha infectada con VHSV por baño (abajo), donde se pueden observar algunos signos externos de la infección como exoftalmia, hemorragias y abdomen hinchado.

## INTRODUCCIÓN

### 2.1.2. La necrosis hematopoyética infecciosa (IHN)

La necrosis hematopoyética infecciosa afecta principalmente a salmónidos y puede llegar a ocasionar un 100% de mortalidad (Wolf, 1988a). La enfermedad se describió por primera vez en salmón sockeye del Pacífico (*Oncorhynchus nerka*) en 1944, aunque otros salmónidos tales como la trucha arcoíris, la trucha común o el salmón atlántico también son susceptibles. Actualmente es endémica en Estados Unidos, y se han descrito brotes en Canadá, Taiwán, Japón, Korea y Europa (LaPatra, 1996). En España se notificó una alerta en 2005, pero desde entonces no se han identificado nuevos aislamientos.

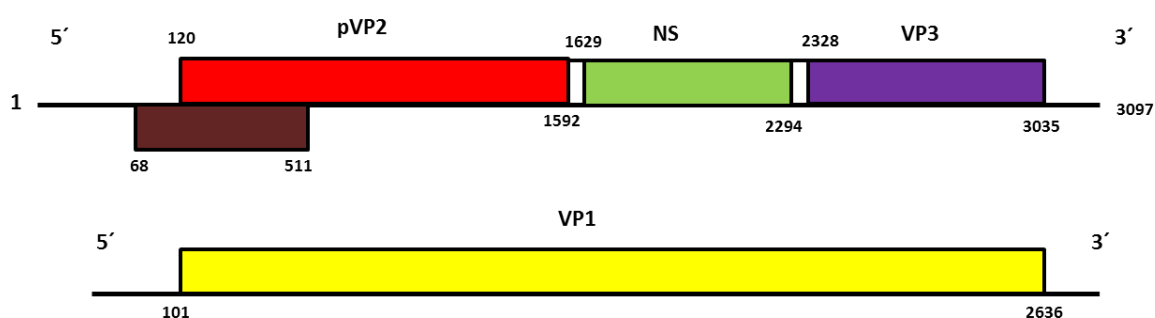
Los signos clínicos para IHN están bien documentados (Amend y Chambers, 1970; Amend y Smith, 1974; Nicholson y Caswell, 1982; Wolf, 1988a). Existe una fase aguda de la enfermedad en la que se puede producir una gran mortalidad sin signos clínicos evidentes. Sin embargo, durante el comienzo de una epizootia, es típico que se encuentre un grupo de peces moribundos letárgicos con periodos esporádicos de hiperactividad (Bootland, 1999). Los primeros signos clínicos son inespecíficos, similares a los observados para VHS, incluyendo a nivel microscópico la necrosis de los tejidos hematopoyéticos del riñón y del bazo, seguido de leucopenia debida a la degeneración y muerte de leucocitos y trombocitos. Los peces más pequeños y de menor peso son los más susceptibles, produciéndose mayores mortalidades en peces menores de seis meses, con mortalidades del 90%, y disminuyendo en peces mayores de seis meses hasta un 50% (Wolf, 1988a). Actualmente no existen vacunas comerciales para IHNV a excepción de una vacuna ADN autorizada desde 1995 para su uso únicamente en Canadá (Salonius *et al.*, 2007).

### 2.2. Virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)

El IPNV es otro virus de gran impacto en la acuicultura mundial debido a las grandes pérdidas económicas que genera, principalmente en salmónidos. A pesar de ello, no está englobado dentro de los virus de declaración obligatoria de la UE, en gran medida por su amplia distribución y persistencia. IPNV pertenece a la familia *Birnaviridae* y al género *Aquabirnavirus*. La necrosis pancreática infecciosa fue descrita por primera vez en alevines de salmónidos en un criadero de Canadá en 1940. Sin embargo, el virus no fue aislado hasta 1957 en trucha arcoíris en Norteamérica (Wolf, 1988b). En la actualidad es el virus de peces de mayor distribución a nivel mundial y es capaz de infectar una gran variedad de especies de peces tanto de agua dulce como marina. También se ha demostrado que bien distintos

serotipos de IPNV o bien virus muy relacionados con él de difícil clasificación, denominados de forma general birnavirus marinos, infectan a otras especies marinas entre las que además de peces teleósteos se encuentran también anguilas, moluscos y crustáceos (Rodríguez, 1994). La necrosis pancreática infecciosa ha sido reconocida como la de mayor impacto en el cultivo de salmónidos en la Unión Europea y Noruega (Roberts y Pearson, 2005; Smail *et al.*, 2006). En España, IPNV está considerado como virus endémico ya que se encuentra en la mayoría de las instalaciones de trucha arcoíris. Además, en esta especie, se ha demostrado que el virus puede transmitirse verticalmente a la descendencia en el interior del huevo (Rodríguez, 1994).

IPNV al igual que otros birnavirus es un virus no envuelto con genoma ARN de doble cadena bisegmentado (segmentos A y B) (**Figura 4**). El segmento A tiene dos marcos de lectura, el mayor de los cuales codifica para una poliproteína precursora (NH<sub>2</sub>-preVP2-VP4-VP3-COOH) que es escindida por la proteasa viral (VP4) para generar dos proteínas estructurales: la proteína precursora de la VP2 (pre-VP2) y la proteína VP3. El marco de lectura de menor tamaño codifica un péptido no estructural rico en arginina que fue detectado por primera vez en cultivos celulares infectados con el virus (Magyar y Dobos, 1994). El segmento B codifica para una sola proteína, la polimerasa viral ARN dependiente, denominada VP1.

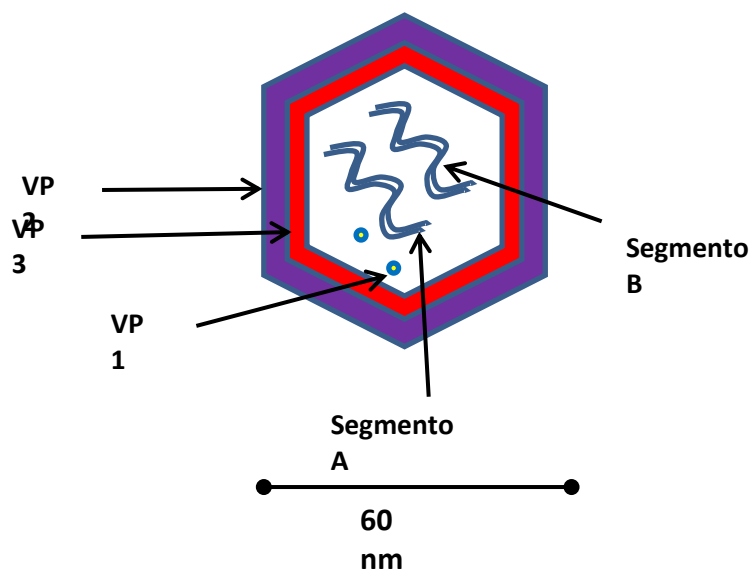


**Figura 4. Organización del genoma de IPNV**

Morfológicamente, IPNV es un virus desnudo compuesto por una cápsida icosaédrica de 60 nm de diámetro, con un patrón isométrico hexagonal. El virus se

## INTRODUCCIÓN

caracteriza por su gran variabilidad antigénica y genotípica, existiendo múltiples cepas que difieren en virulencia (Rodríguez, 1994) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Esquema de la estructura de IPNV

IPNV afecta generalmente a alevines de salmónidos en cultivo intensivo desde el comienzo de la alimentación artificial hasta los 4-6 meses. En algunos casos la mortalidad en alevines puede alcanzar cifras cercanas al 100%, dependiendo de diversos factores como la virulencia intrínseca de la cepa del virus, las condiciones ambientales, la especie afectada, la alimentación, la densidad de población y las situaciones de estrés (Frantsi y Savan, 1971; McAllister y Schill, 1986; Ozaki *et al.*, 2001). Al igual que para la mayoría de los virus de peces, los primeros signos clínicos no son específicos. Los supervivientes a la infección y los animales infectados después de los 6 meses de edad suelen desarrollar una infección crónica, convirtiéndose en portadores asintomáticos. La vía de transmisión puede ser tanto vertical, por el contagio a la descendencia, como horizontal, consecuencia de la diseminación del virus al medio acuático por los peces infectados a través de las heces o los productos sexuales (Mulcahy *et al.*, 1984; Reno, 1999; Rodriguez Saint-Jean *et al.*, 2003; Rodriguez Saint-Jean *et al.*, 1993).

En países como Chile o Noruega se inmuniza a salmónidos con una vacuna frente a IPNV basada en la VP2 recombinante administrada en el marco de una vacunación polivalente frente a patógenos bacterianos. Sin embargo, esta vacuna sólo confiere una protección parcial (50 a un 70% de protección) en ensayos clínicos, lo que hace dudar de su efectividad real en condiciones de campo.

### 2.3. Otros virus que afectan a salmónidos

#### 2.3.1. Virus de la enfermedad del páncreas (PDV)

Otra enfermedad de importante repercusión en Europa, principalmente en las piscifactorías de salmón atlántico y trucha arcoíris, es la enfermedad del páncreas (PD). El agente etiológico es un virus de salmónidos perteneciente a la familia *Togaviridae*, género *Alphavirus* denominado como virus de la enfermedad de páncreas (PDV) o alfavirus de salmónidos 3 (SAV3). PDV posee una envuelta lipídica esférica con una cadena de ARN simple de polaridad positiva. PD se asocia con falta de apetito, letargia y lesiones en el corazón y en el páncreas, llegando a producir mortalidades de hasta el 48% de los individuos (McLoughlin y Graham, 2007). Se ha observado que los peces que sobreviven a la infección de este virus se vuelven altamente resistentes a la re-infección, lo que sugirió la posibilidad de la vacunación como método de control. Actualmente existen dos vacunas comerciales frente PDV basadas en virus inactivados producidas por Pharmaq e Intervet Norbio, aunque sus niveles de eficacia real a nivel de campo no se han establecido.

#### 2.3.2. Virus de la enfermedad de la anemia infecciosa del salmón (ISAV)

La enfermedad de la anemia infecciosa del salmón (ISA) ha producido grandes daños en Noruega (donde se aisló por primera vez), en Norteamérica (EEUU y Canadá) y en Chile (Plarre *et al.*, 2005). El virus que la provoca, virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) pertenece al género *Isavirus* dentro de la familia *Orthomyxoviridae*. Este virus posee envuelta lipídica y un genoma compuesto de ocho segmentos monocatenarios de ARN de polaridad negativa. El virus afecta principalmente al salmón atlántico cultivado (Thorud, 1988) pero también se han descrito casos en trucha común, en carbonero (*Pollachius virens*) y en bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) generalmente mantenidos en agua marina o expuestos al agua de mar (Mjaaland *et al.*, 1997; Nylund *et al.*, 2007). Se trata de una enfermedad de transmisión



## INTRODUCCIÓN

horizontal, que puede llegar a ser sistémica y mortal, llegando a sobrepasar el 90% de mortalidad en los casos más graves. Se observan manifestaciones en hígado, riñón, intestino y branquias, aunque no necesariamente a la vez. La principal característica del virus es tener actividad hemaglutinante (Kibenge *et al.*, 2004; Mjaaland *et al.*, 1997). No hay por el momento ninguna vacuna comercial frente a este virus.

### 2.3.3 Virus del síndrome de la cardiomiopatía (CMSV)

El síndrome de la cardiomiopatía (CMS) es una enfermedad que afecta principalmente a adultos de salmón atlántico, unos 14 a 18 meses después de la transferencia del mar y cerca de la recolección. Los peces que sufren CMS pueden morir repentinamente sin signos clínicos de la enfermedad, o con signos clínicos externos tan inespecíficos como el comportamiento natatorio anormal. A nivel microscópico, los resultados incluyen el taponamiento cardíaco, con sangre en el saco pericárdico y ascitis de moderada a pronunciada (Amin, 1988; Ferguson, 1990). Recientemente se ha descubierto que el agente causal de la CMV en salmón atlántico se debe a un virus. Un estudio ha revelado que el agente es un virus con doble cadena de ARN. Se realizaron análisis filogenéticos basados en la ARN polimerasa dependiente de ARN (RDRP) que agrupaba el virus con el virus de la mionecrosis infecciosa de camarones y el *Giardia lamblia* virus (GLV), miembros de la familia *Totiviridae* (Haugland *et al.*, 2011). La identificación de un agente causante de la CMS es un paso importante hacia un mejor control de la enfermedad y el posible desarrollo de una vacuna contra el virus.

### 2.3.4. Nodavirus

Además de los virus anteriormente citados, los nodavirus, se consideran un gran problema en el cultivo de especies cultivadas marinas tales como la lubina en la zona del Mediterráneo. Los miembros de la familia *Nodaviridae* producen una enfermedad degenerativa que afecta al cerebro y a la retina de los peces que se ha denominado en algunos casos como necrosis nerviosa vírica (VNN) o retinopatía y encefalopatía vírica (VER). En la actualidad este virus supone un gran riesgo para los criaderos, principalmente los pertenecientes al género *Betanodavirus*, que afectan a jurel, lubina y rodaballo (Mori *et al.*, 1992). Aunque se considera de declaración obligatoria para la OIE, hoy en día no es considerada de declaración obligatoria por la UE, debido en parte a su gran dispersión.

### 3. Organización general del sistema inmune de los peces

Los peces teleósteos son el grupo de vertebrados más primitivo, siendo el primer grupo evolutivo que consta de un sistema inmune completo, con un sistema inmune innato y un sistema inmune adaptativo (DeLuca *et al.*, 1983a). Sin embargo, su sistema inmune adaptativo es más primitivo que el de vertebrados superiores y por ello los peces son más dependientes de la respuesta inmune innata en su defensa frente a patógenos (Bly y Clem, 1991; Douglas *et al.*, 2003). En cualquier caso, ambas respuestas están interrelacionadas ya que la mayoría de sus componentes mientras actúan en la respuesta innata condicionan la respuesta adaptativa.

Entre los sistemas de defensa inmune inespecíficos, los peces cuentan con barreras de superficie como la piel y el mucus que recubre tanto el tracto gastrointestinal así como la piel o las branquias. Asimismo, poseen unos sistemas de defensa internos tanto humorales como celulares. Los primeros consisten en moléculas solubles presentes en los fluidos internos del pez, entre las que se encuentran los interferones (IFN), el sistema del complemento o los eicosanoides. Entre los componentes celulares se encuentran una variedad de leucocitos (monocitos/macrófagos, granulocitos y células citotóxicas no específicas). Estas defensas inhiben indiferenciadamente el crecimiento de microorganismos infecciosos (Dalmo *et al.*, 1997; Heppell y Davis, 2000). La respuesta inmune inespecífica es más rápida que la adquirida y relativamente independiente de la temperatura, lo cual es una ventaja para los vertebrados ectotérmicos, donde la respuesta de anticuerpos puede tardar en elaborarse hasta seis semanas (Ellis, 2001).

El sistema inmune adaptativo se caracteriza por su especificidad y memoria. Las células responsables de esta capacidad son los linfocitos, ya que estos son capaces de reconocer distintos determinantes antigénicos. En peces teleósteos, los principales órganos linfoides son el timo, el riñón anterior y el bazo (Dalmo *et al.*, 1997). También se sabe que existe tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal, que constituye otra fuente de linfocitos. La confirmación de células semejantes a linfocitos B y T en peces teleósteos, surgió tras el uso de anticuerpos monoclonales anti-inmunoglobulina M (IgM), que evidenció la existencia de dos poblaciones distintas (IgM<sup>+</sup> e IgM<sup>-</sup>) (DeLuca *et al.*, 1983a; Secombes *et al.*, 1983), aunque recientemente se ha comprobado que existen otros tipos de Igs de membrana en distintas poblaciones de linfocitos B (IgD e IgT), demostrando por lo tanto que no todos los linfocitos IgM<sup>-</sup> corresponden a linfocitos T.

## INTRODUCCIÓN

Los linfocitos B suponen alrededor del 30% de los linfocitos circulantes, y se localizan principalmente en el bazo (seguido del riñón anterior donde se cree que se originan) (DeLuca *et al.*, 1983b), y son los responsables de la producción de anticuerpos o Igs (Miller *et al.*, 1987). Sin embargo, en unos estudios de Li y col. (Li *et al.*, 2006) se observó que los linfocitos B también llevan a cabo procesos de fagocitosis. Esto sugirió que los linfocitos B de peces teleósteos podrían corresponder a una forma primitiva de linfocitos B de vertebrados, que habría surgido de la especialización de un macrófago, conservando ambas funciones.

Los linfocitos T se localizan en el timo, que se cree su órgano hematopoyético principal, aunque también en bazo y sangre donde constituyen alrededor del 70% de los linfocitos circulantes. Estos participan en la respuesta humoral, poseen actividad citolítica o producen factores de diferenciación y modulación de la respuesta de los linfocitos B tales como IFN, interleuquina 12 (IL-12) ó IFN- $\gamma$ . Estas funciones son propias en mamíferos de linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) y linfocitos T cooperadores (CD4<sup>+</sup>), respectivamente. Sin embargo, no existen marcadores linfocitarios comerciales específicos para peces y por ello no se ha determinado todavía en la mayoría de las especies si estos tipos de linfocitos T ejercen funciones equivalentes a las de mamíferos. A nivel molecular sí que se ha identificado la presencia de CD4 y CD8 en distintas especies de peces lo que sugiere esta diferenciación funcional y en el caso de la trucha arcoíris el uso de un anticuerpo anti-CD8 ha permitido localizar a esta población en distintos tejidos (Fischer *et al.*, 2003; Laing *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 2005).

En los últimos años, se ha llevado a cabo un gran esfuerzo investigador para profundizar en el sistema inmune de los peces teleósteos a nivel molecular. Así, por ejemplo, se han identificado y clonado las secuencias de muchas citoquinas previamente descritas en mamíferos. Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular secretadas por células del sistema inmune y que actúan de forma autocrina o paracrina regulando funciones inmunes tanto específicas como inespecíficas. Las citoquinas suelen agruparse como: IFNs, quimioquinas, ILs, factores de necrosis tumoral (TNFs), factores del crecimiento transformante (TGF) o factores de estimulación de colonias (CSF), aunque cada vez más, estas moléculas se agrupan en base a sus efectos principales.

De las citoquinas identificadas en peces, las más conocidas en cuanto a su papel antiviral son los IFNs. Los IFNs se clasifican en IFN de tipo I (IFNs  $\alpha$  o  $\beta$  principalmente) o

IFN de tipo II o IFN- $\gamma$ . Los IFNs de tipo I tienen un papel fundamental en la respuesta inmune innata, considerándose como la primera línea de defensa antiviral, ya que los IFNs de tipo I inducidos por un virus desencadenan la expresión de cientos de genes diferentes, entre los que se encuentran genes que codifican proteínas con actividad antiviral directa tales como las proteínas Mx, generando así un estado antiviral en las células. Sin embargo, al igual que en mamíferos, se ha observado recientemente que no todos los IFNs de tipo I poseen actividad antiviral (Demmers *et al.*, 2001).

Otras citoquinas que se han identificado en peces son las ILs como la IL-1 $\beta$  (Secombes, 1998), IL-6, (Secombes *et al.*, 2001), IL-8 (Laing *et al.*, 2002), IL-10 (Harun *et al.*), IL-12 (Yoshiura *et al.*, 2003). En principio esta nomenclatura agrupaba a citoquinas producidas por leucocitos. Sin embargo, ahora dentro de esta categoría se encuentran citoquinas con una gran variedad de funciones.

Por otro lado también se han identificado varias quimioquinas (citoquinas con actividad quimiotáctica) en distintas especies. Estas citoquinas se caracterizan por la presencia de cuatro residuos de cisteínas y se dividen en cuatro subfamilias en función de la posición de las dos primeras cisteínas en su secuencia: CXC ( $\alpha$ ), CC ( $\beta$ ), C y CX<sub>3</sub>C (Bacon *et al.*, 2002). En mamíferos, el mayor número de quimioquinas pertenece a la familia CC y esta proporción se mantiene en peces (Peatman y Liu, 2007). También se han descrito distintas quimioquinas del tipo CXC en varias especies de peces. Sin embargo, hasta el momento, sólo se han identificado quimioquinas C en pez cebra (Nomiya *et al.*, 2008), mientras que nunca se han descrito en peces quimioquinas CX<sub>3</sub>C. Son muy pocos los ensayos de actividad que se han realizado hasta el momento con estas moléculas, por lo que aún se desconoce el papel que tienen en el sistema de defensa antiviral.

Los factores de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) son los principales mediadores de la respuesta inmune frente a bacterias Gram negativas, ya que son inducidos por la exposición a los lipopolisacáridos (LPS), componentes activos de las paredes de estas bacterias, y se ha comprobado que son secretados por los macrófagos en trucha arcoíris (MacKenzie *et al.*, 2003).

Respecto a los factores de crecimiento transformante (TGFs), existen muy pocos estudios acerca de ellos en peces. El TGF- $\beta$  es capaz de inhibir el efecto de sobrenadantes con actividad MAF (factor activador de macrófagos) y del TNF $\alpha$  en el estallido respiratorio de macrófagos, siendo sus efectos generalmente inmunosupresores (Jang *et al.*, 1995).

## INTRODUCCIÓN

### 4. Vacunas frente a enfermedades virales en peces.

A pesar de que existe un gran número de vacunas comerciales frente a bacterias para uso en peces, el número de vacunas frente a virus de peces es muy limitado, no existiendo tampoco ninguna vacuna comercial frente a parásitos en estas especies. Además y aun siendo la vacunación la única forma eficaz y sostenible de prevenir las infecciones virales, las pocas que realmente si están disponibles, generalmente no confieren unos grandes niveles de protección cuando se utilizan en condiciones de campo.

Una vacuna ideal debería generar una respuesta inmune muy similar a la de la infección real. Asimismo debe ser efectiva tanto en los estadíos tempranos de la infección como en posteriores infecciones causadas por el mismo patógeno, es decir, que sea persistente a largo plazo. También es muy aconsejable que no produzca efectos secundarios y que la administración de una dosis única sea suficiente para conferir protección. Respecto a los factores económicos, la vacuna ideal debe ser estable para facilitar su transporte y económicamente rentable. Debe de ser segura para el medio ambiente y la salud del consumidor.

Por el momento, para la mayoría de las infecciones de peces no se conocen los mecanismos inmunológicos a través de los cuales se adquiere la protección, lo que dificulta en gran medida el diseño de vacunas de forma racional, no basadas únicamente en ensayo y error. Este desconocimiento es aún mayor en el caso de los virus, donde la protección no suele ir ligada a la producción de anticuerpos, considerándose por lo tanto estos estudios fundamentales.

#### 4.1. Tipos de vacunas

##### - Vacunas inactivadas

La mayoría de las vacunas inactivadas para peces se utilizan frente a patógenos bacterianos. La ruta de administración y la utilización de adyuvantes tienen gran importancia en el éxito de estas vacunas, que generalmente se administran intraperitonealmente con adyuvantes oleosos (Gudding *et al.*, 1999). También se han desarrollado vacunas inactivadas frente IPNV en salmón atlántico y frente a la enfermedad hemorrágica de la carpa con cierto éxito. Algunos países han comercializado la vacuna inactivada frente a IPNV (laboratorios: Agrovét, Pharmaq, AquaHealth, Novartis, Shering Plough, Centrovét y Recalcine), aunque la

inmunidad creada es a corto plazo y los anticuerpos no previenen infecciones posteriores (Rodriguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

### **- Vacunas atenuadas**

Las vacunas atenuadas producen un efecto similar a una infección real (con una cepa atenuada) y como la propagación de la cepa la llevan a cabo los peces vacunados, la diseminación del antígeno en la población tendría lugar durante un periodo largo de tiempo. Además estas vacunas tienen la ventaja de que generalmente estimulan una respuesta celular junto con la respuesta humoral (Marsden *et al.*, 1996), su suministro es simple y las dosis requeridas son bajas debido a la diseminación del patógeno por los individuos vacunados. Posiblemente estas vacunas tendrían un gran potencial en acuicultura (Benmansour y de Kinkelin, 1997), sin embargo, no se utilizan bajo condiciones naturales por requerir un estricto control de la reversión y su posible diseminación incontrolada. Además existe el riesgo de que aunque la cepa vacunal no sea virulenta para unas especies, sí puede serlo para otras.

### **- Vacunas de subunidades / recombinantes**

Las vacunas de subunidades son aquellas que contienen un preparado de subunidades antigénicas que pueden ser de distinta naturaleza como lipopolisacáridos, extractos ribosómicos, o proteínas purificadas o sintetizadas químicamente. Estas vacunas se suelen emplear cuando han sido aislados los componentes responsables de la inmunogenicidad del agente infeccioso, ya que de esta forma se evita el riesgo de desencadenar la enfermedad tras la vacunación. Su producción es sencilla, eficiente y barata y en el caso de los virus se basa en la obtención por ADN recombinante de proteínas víricas capaces de inducir inmunidad y protección en el animal. Las proteínas antigénicas identificadas se pueden obtener a partir de los genes virales clonados en una gran variedad de vectores y sistemas de expresión.

Una variación dentro de la producción de vacunas recombinantes, en el caso de virus no envueltos, sería la posibilidad de formar cápsidas vacías o “virus-like particles” (VLPs). Basándose en el hecho de que ante la expresión de las proteínas de la cápsida en cualquier sistema de expresión éstas se agregan de forma natural para formar partículas virales, la producción de estas proteínas en distintos sistemas de expresión daría lugar a estas

## INTRODUCCIÓN

estructuras altamente antigénicas que simulan exactamente a un virus, aunque no siendo infecciosas por no contar con la presencia de material genético.

### **-Vacunas ADN**

El desarrollo de las vacunas ADN se basa en la administración de un plásmido de expresión eucariota que codifica para una/s proteína/s patógenas, capaz de expresar dicho antígeno de modo eficaz y con una correcta conformación dentro del hospedador (Leong *et al.*, 1997). La inmunización con ADN recombinante ofrece bastantes ventajas sobre los métodos convencionales, puesto que éstas no revierten, no parecen provocar efectos secundarios, tienen una gran estabilidad y además, suelen conferir una protección eficaz en el caso de las enfermedades virales. Esto es debido a que las vacunas ADN estimulan el sistema inmune de una manera muy parecida a como lo haría una infección viral real.

### **- Vacunas sintéticas**

Son las vacunas elaboradas a partir de la síntesis exclusiva de segmentos de péptidos considerados esenciales para desencadenar una respuesta inmunológica. Sin embargo hoy en día no están disponibles para peces ya que, aunque son seguras, estables, y sencillas, es necesario conocer más sobre la respuesta inmune en teleósteos y el papel de las células inmunitarias para que puedan llegar a ser eficaces y rentables (Rodriguez Saint-Jean *et al.*, 2003).

## **4.2. Vacunas experimentales frente a *Novirhabdovirus***

Para el diseño de vacunas frente a rabdovirus, todo el trabajo se ha centrado en la expresión de la proteína G de la envoltura del virus ya que se ha demostrado que es la proteína más inmunogénica y la única frente a la que se producen anticuerpos neutralizantes (Corbeil *et al.*, 1999). Sin embargo, tanto en el caso de VHSV como en el de IHNV, la inmunización mediante glicoproteínas recombinantes sólo confirió unos niveles moderados de protección (Lorenzen y Olesen, 1997; Lorenzen *et al.*, 1993b).

Por el contrario, la vacunación ADN frente a VHSV y otros rabdovirus importantes en salmónidos, tales como IHNV, basada en plásmidos que codifican la glicoproteína G viral bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (CMV) ha conseguido alcanzar niveles de protección total (Anderson *et al.*, 1996a; Lorenzen *et al.*, 1998b). Otras

construcciones que codifican otras proteínas de rabdovirus (Nv, P, N, M), no han conseguido conferir protección (Corbeil *et al.*, 2000b).

Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos con estas vacunas, quedan algunos aspectos todavía sin resolver tales como la administración (la única vía de administración eficaz hoy en día es por inyección intramuscular), unos elevados costes de producción (se necesitan de 1 a 10 µg de plásmido por trucha), y las reticencias en Europa al uso de un promotor que regula la transcripción en células humanas por razones de seguridad (Alonso *et al.*, 2003). Todos estos inconvenientes hacen que en la actualidad no exista ninguna vacuna comercializada frente a VHSV en uso, a pesar de que para IHNV sí que se ha comercializado una vacuna ADN para uso en Canadá (Novartis).

Otro de los principales problemas que impide un mayor desarrollo de estas vacunas, así como la obtención de nuevas estrategias vacunales, es el desconocimiento de los mecanismos de defensa a través de los cuales la vacuna confiere protección. Se sabe que ante la administración de una vacuna ADN frente a rabdovirus en peces se produce durante un primer momento una fase de protección denominada como temprana en la que los peces están protegidos no sólo frente al patógeno frente al cual se vacunó sino frente a cualquier virus, aunque no frente a bacterias. Este periodo que suele durar unas dos semanas como máximo va seguido de una fase en la que se observa una protección tardía en la que ya los peces están únicamente protegidos frente al virus para el que fueron vacunados (LaPatra *et al.*, 2001; Lorenzen *et al.*, 2000). Se han realizado, al igual que frente al virus, distintos estudios centrados en ver a nivel transcripcional que genes se regulan frente a la vacunación (Purcell *et al.*, 2004; Purcell *et al.*, 2006), y en algunos casos concretos se ha señalado una correlación entre los niveles de protección conferida y los niveles de IFN que muy posiblemente esté mediando la protección sobre todo esta primera fase de protección temprana (McLauchlan *et al.*, 2003). Sin embargo, y a pesar de que la vacunación induce la producción de anticuerpos frente a VHSV, no siempre existe una correlación clara entre protección y anticuerpos. Por ejemplo, mientras que los anticuerpos post-vacunación desaparecen a los 6 meses de la vacunación, los peces están protegidos durante al menos 2 años, sin que un posterior encuentro con el virus induzca una respuesta secundaria significativa (McLauchlan *et al.*, 2003).

Debido a su alta eficacia se continua estudiando y debatiendo problemas asociados a su uso, como es la duración del efecto, la presencia del ADN plasmídico y su distribución en



## INTRODUCCIÓN

el organismo, así como la cantidad necesaria a administrar para crear el efecto deseado, o posibles conflictos a nivel social y ético con la calificación y diferenciación entre animales vacunados con vacunas ADN y organismos modificados genéticamente (Gillund *et al.*, 2008; Lorenzen y LaPatra, 2005; Tonheim *et al.*, 2008).

### 4.3. Vacunas experimentales frente a IPNV

En cuanto a IPNV, por tecnología recombinante, Shivappa y col. en 2005 clonaron el segmento A del virus IPN en un sistema de expresión de baculovirus utilizando células de larvas de insecto, lo cual dio lugar a la obtención de VLPs del virus (Shivappa *et al.*, 2005). Probaron la inmunogenicidad de estas partículas administrándolas como vacuna por inmersión en trucha arcoíris, y por inyección intraperitoneal en salmón atlántico, aunque sólo en este último caso se pudo observar una disminución de la mortalidad en un posterior desafío de los animales con virus vivo. Otro estudio que se ha realizado es el de Allunt y col. en el que truchas arcoíris se vacunaban intraperitonealmente con partículas subvirales de la proteína recombinante VP2 producidas en levaduras o con la levadura recombinante incorporada a los piensos de pescado (Allnutt *et al.*, 2007). En ambos casos se produjeron anticuerpos específicos anti-IPNV y observó que los peces vacunados tenían niveles de virus infectivo menores que los peces no vacunados a los 10 días post-infección.

Por otra parte, sólo se han realizado algunos ensayos con vacunas ADN para otros virus distintos a los rabdovirus, tales como IPNV. Existen dos trabajos contradictorios en los que un plásmido que codifica la proteína VP2 de la cápsida viral protege eficazmente en unas ocasiones y en otras no. En el trabajo publicado por Mikalsen y col., sólo cuando el plásmido que codificaba para la VP2 se acompañaba de otro en el que se codificaba para la poliproteína completa se observa protección (Mikalsen *et al.*, 2004). Sin embargo, otros autores han demostrado la efectividad de vacunas ADN basadas únicamente en la expresión de la VP2, siendo eficaces incluso mediante administración oral por medio de microesferas de alginato (de las Heras *et al.*, 2010). También se ha comprobado que la vacuna ADN que codifica la poliproteína viral completa que al ser procesada da lugar a la VP2 y VP3 y por lo tanto forma VLPs, induce la producción de anticuerpos y disminuye la carga viral ante un posterior encuentro con IPNV (Cuesta *et al.*, 2010). Tampoco en este caso, se conocen los mecanismos a través de los que media la inmunidad inducida, ni si la administración directa en forma de VLPs es una mejor o peor alternativa a la vacuna ADN.

#### 4.4. Adyuvantes en vacunación

Una de las posibilidades para aumentar la inmunogenicidad de una vacuna, y por lo tanto aumentar la protección que esta confiere, es la administración conjunta de ésta con un adyuvante. Los adyuvantes actúan fundamentalmente favoreciendo la presentación de los antígenos al sistema inmune, mediante el secuestro de los antígenos vacunales y la posterior liberación de manera lenta y prolongada, así como produciendo una ligera inflamación que activa la atracción de las células presentadoras. Si esto conlleva el aumento de la capacidad y la duración de la protección que confiere una vacuna, la dosis de vacuna a emplear podría disminuir, lo que significaría una reducción en los costes de producción. En cualquier caso, los mecanismos de actuación de la mayor parte de adyuvantes no se conocen exactamente.

Se han definido dos tipos de adyuvantes (Schijns, 2001). La primera categoría incluye a los llamados facilitadores de señal 1, que influyen en el destino del antígeno de la vacuna en tiempo, lugar y concentración, mejorando en última instancia la inmunodisponibilidad del antígeno. El segundo gran grupo lo constituyen los facilitadores de señal 2, que proporcionan la correcta co-estimulación de señales para las células antígeno-específicas del sistema inmune adaptativo durante el reconocimiento del antígeno. Ambas clases de adyuvantes no son mutuamente excluyentes.

##### - Emulsiones con aceites

Esta clase de adyuvantes incluyen las emulsiones de tipo aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O), dependiendo de cuál sea la fase dispersa y la fase continua. Los aceites utilizados suelen ser de origen mineral. El mecanismo de acción de estos adyuvantes consiste en la formación de un depósito en el sitio de inyección, permitiendo una liberación del antígeno más lenta que mejora la estimulación de las células plasmáticas productoras de anticuerpos. Por lo tanto, pertenecen a la categoría de adyuvantes denominados facilitadores de señal 1, cuya función es en primera instancia la presentación del antígeno a las células del sistema inmune. En un experimento realizado por Gundding y col. en 1999, la efectividad de una vacuna frente a furunculosis y vibriosis administrada sola frente a la de ésta con adyuvante oleoso resultó en una inducción inmune más larga y protectora (Gudding *et al.*, 1999). En términos del nivel de protección, según este estudio, el uso de estos adyuvantes no produciría la aparición de brotes de la enfermedad tras la transferencia al agua del mar.

## INTRODUCCIÓN

Como contrapunto, estos adyuvantes producen efectos secundarios frecuentes tales como reacciones inflamatorias, granulomas y úlceras en el sitio de inyección, lo que puede comprometer tanto el bienestar de los peces así como la calidad del producto final. En peces, la mayoría de las vacunas inactivadas, como las bacterinas, son poco inmunogénicas y suelen administrarse con adyuvantes oleosos cuando se administran intraperitonealmente. También se administra con este tipo de adyuvantes la vacuna polivalente frente a distintas bacterias de salmónidos que en algunos casos se combina con la proteína VP2 de IPNV (Biering *et al.*, 2005).

### - Sales de aluminio

Las sales de aluminio utilizadas como adyuvantes son principalmente el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio. Se asume que las partículas de aluminio adsorben el antígeno, lo que produce un depósito de este en el sitio de inyección. Se cree que esto prolonga la disponibilidad del antígeno (por lo tanto sería un facilitador de señal 1) para la presentación del antígeno a las células presentadoras de antígeno. Sin embargo se han realizado estudios en los que se han propuesto diversos mecanismos responsables de los efectos adyuvantes de estas sales. Se ha comprobado que el aluminio fija el complemento (Ramanathan *et al.*, 1979), causa granulomas (White *et al.*, 1955) y recluta eosinófilos y neutrófilos (Eisenbarth *et al.*, 2008). Los mecanismos mediante los cuales el aluminio produce estos efectos son desconocidos por el momento.

A pesar de que las vacunas administradas mediante sales de aluminio son generalmente bien toleradas, son frecuentes también la formación de granulomas y lesiones en el sitio de inyección. A pesar de esto, se han publicado algunos estudios utilizando fosfato de aluminio como el estudio realizado en salmón atlántico en el que se observó que este adyuvante provocaba lesiones de mínimas a moderadas (Midtlyng *et al.*, 1996).

### - Adyuvantes moleculares

En el caso de las vacunas ADN, existe la posibilidad de utilizar adyuvantes moleculares incluidos en el propio plásmido vacunal, como por ejemplo la introducción de motivos CpGs. Los CpGs son secuencias de ADN repetitivo no metiladas. Estas secuencias son muy comunes en el material genético procariota y en el genoma de algunos virus, pero no en el ADN de vertebrados, cuyas secuencias CpG están generalmente metiladas en la citosina de la posición 5' (Krieg, 2000). Estos fragmentos de ADN se engloban dentro el

grupo de “señales de alarma” que existen en los distintos tipos de patógenos, y que el organismo es capaz de detectar mediante la activación de receptores de tipo Toll (Medzhitov, 2001). La activación de estos receptores induce principalmente la secreción de citoquinas de tipo Th1 (Krieg *et al.*, 1998). Existen varios estudios centrados en la capacidad inmunoestimulante de los CpGs. Se ha comprobado que estas secuencias son capaces de activar la producción de IFN por parte de leucocitos de salmónidos (Jorgensen *et al.*, 2001a; Jorgensen *et al.*, 2001b), la producción de IL-1 $\beta$  de macrófagos (Jorgensen *et al.*, 2001b) y la proliferación linfocitaria de trucha arcoíris (Carrington *et al.*, 2004), así como la actividad de células citotóxicas inespecíficas en pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Oumouna *et al.*, 2002). En un estudio de Chen y col. se comprobó que estas secuencias aumentaban la proliferación linfocitaria y la activación de macrófagos en *Carassius auratus* (Chen *et al.*, 2007). También se ha demostrado que los CpGs son capaces de conferir cierta protección frente a distintos patógenos. En un estudio de Jørgensen y col. se vio que los CpGs conferían cierta protección frente a IPNV en salmón atlántico (Jorgensen *et al.*, 2003). Otros estudios lo han demostrado frente a patógenos como amebas (Bridle *et al.*, 2003), así como frente a *Edwardsiella tarda* en lenguado japonés (Lee *et al.*, 2003).

A pesar de todos estos estudios relacionados con la capacidad inmunoestimulante de los CpGs, sólo se han realizado unos pocos que estén centrados en su posible actividad adyuvante en las vacunas ADN (Kanellos *et al.*, 1999; Ortega-Villaizán *et al.*, 2009).

Otra de las opciones que se explora en el campo de la vacunación ADN, es la utilización de citoquinas como adyuvantes, que aumentan la respuesta inmune en el momento de encuentro con el antígeno, mejorando así la protección. La citoquina recombinante se podría administrar en paralelo a la vacunación o incluyendo su gen bajo el control de otro promotor dentro del mismo plásmido vacunal o en otro plásmido independiente. En vertebrados superiores el mayor número de estudios en este campo se ha realizado con citoquinas cuya función es la estimulación de la proliferación de linfocitos en el momento del encuentro con la vacuna o bien con citoquinas que promueven un mayor reclutamiento de células inmunes al sitio de expresión del antígeno, como las quimioquinas. El uso de las quimioquinas como adyuvantes generalmente ha proporcionado resultados positivos ya que se produce una mayor infiltración de células inmunes al sitio de expresión de la vacuna. (Kim *et al.*, 2000; Sin *et al.*, 2000).

## INTRODUCCIÓN

En peces, cuando la vacuna ADN frente a VHSV se administra conjuntamente con un plásmido que codifica para la IL-8 de trucha arcoíris, se modula la expresión de algunas de las citoquinas que son inducidas en respuesta a la vacunación tales como la IL-11, IL-18 o el TNF- $\alpha$ , y sobre todo, se produce un importante efecto sobre las de tipo pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ 1)(Sanchez *et al.*, 2007).

### 4.5. Métodos de administración alternativos

Debido a la singularidad de los peces, las rutas de administración de las vacunas para estos animales acuáticos debe permitir la vacunación de un gran número de animales. Además, la administración no sólo debe ser lo menos invasiva posible, sino que también es importante que sea viable administrarla en los primeros meses de vida de los peces. Los principales métodos de vacunación en los peces son: inmersión en una solución vacunal, inyección intraperitoneal (lo que requiere que el animal tenga más de 15 g de peso), inyección intramuscular (principalmente para vacunas de ADN) y administración oral junto con el pienso. Siguiendo los criterios de idoneidad anteriormente descritos, las rutas óptimas para vacunación de peces serían la inmersión o la ruta oral, sin embargo para muchas vacunas estas rutas continúan sin ser factibles.

#### - Vacunación por inmersión

Es un método ideal para vacunar un gran número de peces de pequeño tamaño (Evans *et al.*, 2004; Pasnik *et al.*, 2005). En la vacunación por inmersión los peces son sumergidos en una solución vacunal concentrada. Este método es más usado que la vacunación oral y normalmente provee mejor protección, posiblemente por la mejor absorción del antígeno a través de la piel y/o las branquias, porque se evita la degradación de la vacuna en el estómago y además porque algunos antígenos bacterianos ingresan además de por las anteriores rutas también a través de la mucosa gastrointestinal (Bowden, 2003b; Klesius *et al.*, 2004; Lin, 2000; Shao, 2001). Actualmente, esta vía de administración es la más utilizada para vacunación con bacterias inactivadas, aunque no es eficaz de la misma forma para virus inactivados.

Para vacunas ADN, se ha propuesto utilizar esta vía combinada con inmersiones previas en soluciones hiperosmóticas (Huising *et al.*, 2003), o con la exposición de los peces a ultrasonidos de baja frecuencia (Fernandez-Alonso *et al.*, 2001). Experimentalmente, estas

modificaciones mejoran la penetración del ADN a través de la piel en la vacunación por inmersión (Nakanishi *et al.*, 2002; Navot *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2002a; Zhou *et al.*, 2002b), pero aún así sólo se llega a un 50% de protección (Fernandez-Alonso *et al.*, 2001) en comparación con el 90-100% alcanzado con las vacunas ADN administradas intramuscularmente. También se ha probado el bombardeo de partículas de oro cubiertas de ADN vacunal (Tucker *et al.*, 2000), comprobándose que por este método se consigue una expresión del antígeno durante 60 días. Otro reto para mejorar la protección alcanzada mediante esta vía de administración sería encontrar la manera de proteger los antígenos que se puedan degradar en el agua. Sin embargo puede ocurrir que esto encarezca el proceso de vacunación, lo cuál implica una desventaja.

### **- Administración oral de vacunas**

La vacunación oral es otro método óptimo de inmunización en acuicultura por la facilidad del procedimiento, por los costes relativamente bajos y porque no causa ningún tipo de estrés a los peces (Bowden, 2003b; Romalde, 2004; Shao, 2001; Vandenberg, 2004). Otra ventaja adicional, es la estimulación de inmunidad en las mucosas (Lin, 2000; Vandenberg, 2004), que puede ser adecuada para determinados patógenos para los que este tipo de inmunidad sea relevante en la protección. Sin embargo, los niveles de protección obtenidos con esta ruta de administración son generalmente bajos para cualquier tipo de vacuna, y solamente existen algunas vacunas orales frente a bacterias en el mercado que en realidad se utilizan como “boosters” (aumentadores) de previas vacunaciones intraperitoneales o por baño.

Los principales inconvenientes de la vacunación oral son la dificultad para determinar la dosis consumida por cada pez, los niveles bajos de protección alcanzados por estas vacunas cuando se comparan con los de inyección (Heppell y Davis, 2000) y la necesidad de recubrir los antígenos para evitar su destrucción. Se han considerado diferentes enfoques para la administración de vacunas orales en peces, incluyendo todo tipo de vacunas, tanto vacunas de ADN como patógenos atenuados o antígenos recombinantes, con el objetivo primordial de proteger el antígeno o ADN vacunal de los jugos gástricos del estómago, o incluso su destrucción en el medio acuático. Por ejemplo crear microesferas de diferentes materiales y técnicas (liposomas, biofilms, microesferas de alginato, etc.) para diferentes patógenos (Lin *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2006; Romalde, 2004; Tian *et al.*, 2008a; Tian *et al.*, 2008b; Wong *et al.*, 1992). En cualquier caso, nos queda mucho por investigar en este

## INTRODUCCIÓN

terreno, incluyendo una mayor compresión de la inmunidad en mucosas, factor primordial para poder optimizar vacunas orales para aquellos patógenos que realmente requieran este tipo de inmunidad.

### - Vacunación intraperitoneal

Esta ruta es muy efectiva a la hora de inducir protección, asegura una dosis idéntica en todos los individuos y permite la adición de adyuvantes que estimulan protección por más tiempo (Bowden, 2003b; Evans *et al.*, 2004; Gudding *et al.*, 1999; Klesius, 2000; Midtlyng *et al.*, 1996). Sin embargo, los costos y las dificultades de implementación, el estrés excesivo que induce en los peces, sumado a la poca viabilidad en peces pequeños, y a la estimulación deficiente de inmunidad a nivel de superficies, hacen que la inyección de vacunas se limite a ciertas especies de peces, a patógenos determinados y a sistemas de producción particulares, como es el caso de la vacunación de salmónidos contra patógenos bacterianos (Midtlyng *et al.*, 1996). La administración de adyuvantes oleosos junto con la vacuna prolonga la duración de la protección y sirve como inmunoestimulante, pero su aplicación puede resultar en adherencias a la pared abdominal que dificultan el proceso de eviscerado o pueden llevar al rechazo del producto (Bowden, 2003a; Midtlyng *et al.*, 1996; Shao, 2001).

También es un método posible para la administración de virus inactivados o incluso VLPs. Estudios previos de vacunación intraperitoneal con VLPs frente a IPNV en trucha arcoíris demostraron una disminución de la mortalidad aun sin la utilización de adyuvantes (Shivappa *et al.*, 2005).

### - Vacunación intramuscular

La vacunación intramuscular en peces, a excepción de algunos trabajos experimentales con bacterinas (Klesius, 2000), se limita a la evaluación de vacunas basadas en tecnología de ADN. Tal como hemos descrito anteriormente, se han realizado estudios en los que se ha comprobado que la glicoproteína G de los rabdovirus es un potente inductor de anticuerpos neutralizantes (Boudinot *et al.*, 1998; Lorenzen *et al.*, 1993a; Rocha *et al.*, 2002) cuando se administra intramuscularmente el plásmido que codifica la proteína G, sin embargo estos niveles de protección nunca se han logrado por otras vías de administración. El problema es que esta ruta es laboriosa a pesar de que se han diseñado maquinas que permiten la vacunación automática, y al igual que la inyección intraperitoneal, sólo es viable

en animales de un cierto tamaño. El problema añadido además es que la señal que deja en el músculo puede llegar a limitar el consumo de peces vacunados.

### **- Otras vías de inmunización**

La intubación anal ha demostrado buenos resultados de protección de forma experimental ya que los antígenos no son afectados en su paso por el tracto digestivo superior como ocurre con las vacunas orales. Sin embargo, de momento este método no es viable ni técnica ni económicamente en la mayoría de sistemas productivos piscícolas (Bowden, 2003b).





### **III. OBJETIVOS**



Esta tesis doctoral pretende profundizar en los mecanismos inmunes que se inducen en métodos de vacunación antivirales efectivos para peces, para así contribuir a un mejor entendimiento de que mecanismos inmunes pueden ser responsables de conferir protección en estos sistemas. Utilizando distintos métodos previamente identificados como efectivos en su capacidad para conferir protección tales como las vacunas ADN frente a *Novirhabdovirus* o las partículas virales vacías o VLPs frente a IPNV, así como distintos métodos de administración y modificaciones con posibles efectos inmunes, hemos podido identificar algunos mecanismos importantes en la respuesta inmune antiviral de peces, junto con la evaluación de nuevas modificaciones o métodos de administración alternativos a los previamente existentes. Concretamente, los objetivos de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Estudiar los posibles efectos en la inmunogenicidad de la introducción de varias copias de un fragmento rico en motivos CpG en una vacuna ADN.
2. Estudiar la infiltración celular en el músculo en respuesta a la inyección de vacunas ADN, determinando las quimioquinas responsables de la infiltración y valorando además la posibilidad de que se pudieran observar diferencias entre distintas vacunas codificando para distintos antígenos.
3. Evaluar la posibilidad de administrar las vacunas ADN frente a VHSV mediante alginatos, caracterizando la respuesta inmune inducida a nivel de la mucosa, así como la protección conferida.
4. Estudiar la respuesta inmune inducida por una potencial vacuna frente a IPNV, consistente en VLPs tanto a nivel sistémico como a nivel local (en el peritoneo).



## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 1. Líneas celulares y virus utilizados

#### 1.1. Líneas celulares estables

En este trabajo siempre se utilizó la línea celular RTG-2 que es una línea establecida de fibroblastos obtenida a partir de gónadas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en 1962 (Wolf y Quimby, 1962). Esta línea se mantuvo a 18°C en medio MEM (Minimal Essential Medium, Gibco, Invitrogen) suplementado con penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y 10% de suero fetal bovino (FCS) previamente descomplementarizado (30 min a 56°C).

#### 1.2. Producción de stocks virales

En esta Tesis Doctoral se utilizó la cepa de referencia Europea 0071 del virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV) y la cepa Sp el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV). Ambos virus se propagaron en la línea celular RTG-2 para la obtención de “stocks” virales. Para ello, los frascos con monocapas confluentes de RTG-2 se vaciaron de medio de cultivo para posteriormente inocular virus a una concentración equivalente a una multiplicidad de infección de 0,1. Después de un periodo de adsorción de 30 min a 5-10°C, se cubrió el tapiz celular con medio de mantenimiento (medio MEM suplementado con antibióticos y el 2% FCS). Las células se incubaron con el virus a 14°C hasta observar un efecto citopático extendido, tras lo cual se congelaron para romper las células y liberar el virus. Se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 2000 x g durante 15 min a 4°C para retirar los posibles restos celulares, quedando ya listos para su uso. Todos los preparados de virus fueron titulados y almacenados a -80°C.

#### 1.3. Titulaciones virales

Las titulaciones virales se llevaron a cabo de acuerdo con el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938). Se prepararon diluciones seriadas del virus problema en medio MEM con antibióticos y 2% de FCS. Se inocularon tres réplicas de cada dilución (100 µl/pocillo) en una placa de microtitulación de 96 pocillos con monocapas confluentes de células RTG-2, y se incubaron a 14°C. Tras 5-7 días de infección, la lectura del título se



## MATERIALES Y MÉTODOS

expresó como la dosis infectiva citotóxica al 50% (dilución del virus para la que se observan lisis celular en la mitad de los pocillos inoculados) (TCID<sub>50</sub>/ml).

## 2. Vacunas frente a VHSV, IHNv e IPNV

### 2.1. Vacunas ADN frente a rabdovirus (VHSV, IHNv).

En los experimentos realizados para determinar los efectos de la inclusión de motivos CpG en las vacunas ADN frente a VHSV, se utilizó el plásmido pMCV1.4-G en el que el gen de la glicoproteína G de VHSV se ha clonado en el plásmido pMCV1.4 bajo el control del promotor largo del citomegalovirus (CMV). Este plásmido utilizado con anterioridad en nuestro grupo y otros (Cuesta y Tafalla, 2009; Rocha *et al.*, 2004), contiene el gen  $\beta$ -galactosidasa además de 218 pares de bases (pb) adicionales de secuencias potenciadoras junto con las 687 pb que componen las secuencias potenciadoras del promotor habitual. pMCV1.4 es más pequeño que su precursor pMOK ya que se le han delecionado aproximadamente 1 Kpb de secuencias de bacteria innecesarias (Ready Vector, Madrid, España). El plásmido vacío pMCV1.4 sin el gen de la proteína G se utilizó en estos experimentos como control.

En los experimentos en los que se estudió la respuesta de quimioquinas en músculo, así como los experimentos para valorar la administración oral de las vacunas ADN, los plásmidos utilizados como vacunas frente a VHSV e IHNv fueron cedidos por el Dr. Niels Lorenzen del DTU National Veterinary Institute de Aarhus (Dinamarca). En estas vacunas los genes de las glicoproteínas virales de VHSV e IHNv se han clonado en el plásmido pcDNA 3.1 bajo el control del promotor temprano de CMV junto con un gen de resistencia a ampicilina. En estos experimentos, el plásmido vacío se utilizó como control negativo.

### 2.2. Propagación de plásmidos por clonación

Todos los plásmidos vacunales y controles producidos en el transcurso de esta Tesis Doctoral se propagaron por medio de transformación en cepas bacterianas competentes y posterior extracción del ADN plasmídico. Para ello, se utilizó la cepa bacteriana de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) con genotipo F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$  (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara* *len*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*). La transformación

de bacterias competentes con el ADN plasmídico se realizó por choque térmico (30 min a 4°C, 45 s a 42°C, 2 min a 4°C), utilizando 20 a 40 ng de DNA para 50 µl de suspensión bacteriana. Las bacterias transformadas se incubaron en 500 µl de medio SOC durante 1 h a 37°C con agitación y posteriormente se sembraron sobre placas con medio LB agar y ampicilina (100 µg/ml). Los clones positivos se identificaron en cada caso por aislamiento el ADN plasmídico y posterior secuenciación utilizando el kit Quiaprep Spin Miniprep kit de Quiagen.

Una vez identificados los clones bacterianos que contenían el plásmido deseado, éstos se crecieron en medio líquido con LB suplementado con ampicilina durante la noche a 37°C para posteriormente aislar el plásmido mediante el uso del kit Pure-Link Hi-Pure Plasmid Filter Midi-Maxi Starter Kit (Invitrogen). La concentración de cada plásmido purificado se determinó por espectrofotometría, repartiéndose en alícuotas y conservándolo a -20°C hasta su posterior utilización.

### 2.3. Cápsidas virales vacías (VLPs) de IPNV

Las cápsidas vacías de IPNV o VLPs fueron cedidas por el Profesor Vikram N. Vakharia del Departamento de Biotecnología Marina de la Universidad de Maryland (USA). Para obtener dichas partículas se había utilizado un sistema de expresión de baculovirus y larvas de insecto que permitiera desarrollar esta vacuna frente a IPNV (Shivappa *et al.*, 2005). Para ello, se construyó un baculovirus recombinante que expresaba las principales proteínas estructurales VP2 y VP3 de IPNV (codificadas en el segmento A). Estas VLPs poseen todos los epítomos de IPNV y por lo tanto mimetizan a un virus infectivo aunque sin replicar en el huésped, ya que las VLPs no contienen el genoma viral.

El número de partículas virales administradas a cada pez en los ensayos se estimó mediante el uso de un kit de ELISA comercial frente a IPNV (BioX Diagnostics) utilizando una curva estándar con diferentes diluciones de IPNV de título conocido.

### 2.4. Introducción de motivos CpG en la vacuna ADN frente a VHVS

Siguiendo el protocolo de Chen y col. (Chen *et al.*, 2007), introdujimos diferentes copias de un fragmento que contenía diversos tándems de CpG-ODNs en la vacuna pVHSV descrita previamente (pMCV1.4-G). Este fragmento de 226 pb rico en CpGs consistía en un

## MATERIALES Y MÉTODOS

tándem de 10 ODNs (ODN 1681, 1669, 2133, 2102, 2143, 2006, 1826, 1670, 1668 y 1651) flanqueados por los sitios de restricción *Sall* y *XhoI*. El fragmento fue sintetizado químicamente y se insertó en un plásmido pUC57 (GenScript). A partir de este plásmido, el fragmento fue liberado por digestión con *Sall* y *XhoI* y entonces introducido secuencialmente en la vacuna pVHSV digerida con *XhoI* usando el protocolo descrito anteriormente por Chen y col. (Chen *et al.*, 2007). *XhoI* y *Sall* son dos enzimas de restricción que producen los mismos extremos cohesivos del producto de digestión y entonces pueden ser ligadas juntas. Sin embargo, el sitio *Sall/XhoI* reconstituido ya no es un sitio *XhoI* mientras que el *XhoI/XhoI* reconstituye el sitio *XhoI*. Por lo tanto, después de haber introducido una copia del fragmento rico en CpG, se reconstituyó el sitio *XhoI* que puede ser utilizado posteriormente para introducir un nuevo fragmento. A continuación, a través de varias digestiones y ligaciones consecutivas, produjimos plásmidos vacunales transformados en los que el fragmento se había introducido 1, 2, 3 ó 4 veces, pasando a designar estos plásmidos como pVHSV-1CpG, pVHSV-2CpG, pVHSV-3CpG o pVHSV-4CpG. Todos los plásmidos producidos fueron secuenciados para verificar la correcta inserción de los fragmentos.

### 2.5. Encapsulación de vacunas ADN en alginatos

Para administrar las vacunas ADN frente a rabdovirus por vía oral, los plásmidos purificados tal como se describió anteriormente (pVHSV, pIHNV y el correspondiente plásmido vacío) se encapsularon en microesferas de alginato siguiendo el protocolo previamente descrito para una vacuna ADN frente a IPNV (de las Heras *et al.*, 2010) basado a su vez en el protocolo de Ji-Yuan Tian y col. (Tian *et al.*, 2008b) con algunas modificaciones.

En un matraz se añadieron 2,5 ml de alginato de sodio al 3% junto con 1,5 ml del plásmido (1 mg/ml). Después de agitar a 500 rpm durante 10 min, la mezcla se añadió a un nuevo matraz con 100 ml de parafina y 0,5 ml de Span 80 y se emulsionó a 900 rpm durante 30 min. Para preparar las microesferas se añadieron 2,5 ml de cloruro de calcio 0,15 M gota a gota y se agitó a 900 rpm durante 2 h. Las microesferas se recolectaron centrifugando a 1000 x g durante 10 min y se lavaron 2 veces con etanol al 70%. Después se liofilizaron durante 48 h y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

Para comprobar la correcta encapsulación y determinar la concentración de plásmido en las microesferas, los plásmidos fueron liberados de éstas mediante incubación de 0,5 ml de microesferas diluidas en solución salina con 5 ml de citrato de sodio 55 mM toda la noche a temperatura ambiente. Se utilizaron 2 µl de cada una de estas soluciones como muestra para realizar una PCR con los primers específicos para la proteína G de VHSV y la de IHNv, y comprobar así la presencia del plásmido en el interior de las esferas de alginato. Los productos de las PCR fueron observados en geles de agarosa al 1,2% y teñidos con bromuro de etidio.

Gen	Primers (5' → 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Condiciones específicas
G de VHSV	F: CCTGTGGACTCAACTCGACCGGC R: CTGTCTTACCTAGTCCTGGCTGGACC	625 pb	94°C 5 min 40 ciclos (94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s) 72°C 10 min
G de IHNv	F: ATTCTGTGGGAAACAGTG R: CTCATAGGGGTACATAGT	753 pb	94°C 5 min 25 ciclos (94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min) 72°C 10 min

Tabla 1. Primers específicos para detectar los genes que codifican la proteína G de VHSV e IHNv por medio de PCR en el interior de las microesferas de alginato.

Por otro lado, con la mezcla incubada se realizaron lecturas en el NanoDrop™ 2000 a las longitudes de onda de 260 y 280 nm, determinándose el grado de pureza según el cociente densidad óptica  $(DO)_{260/280}$ . Se calculó la concentración de los plásmidos (plásmido vacío, pVHSV y pIHNv) por ml de la suspensión de microesferas a partir del valor obtenido según la  $DO_{260}$ , asumiendo que para el ADN de doble hebra 1 unidad de  $DO_{260}$  es igual a 50 mg/ml de ADN. Posteriormente las concentraciones de todos los plásmidos se ajustaron en función de la dosis de administración elegida.

### 3. Protocolos de inmunización

#### 3.1. Peces

Las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) fueron obtenidas siempre de centros de acuicultura localizados en zonas libres de VHSV e IPNV, y suministradas a nuestro laboratorio por el Centro de Acuicultura El Molino (Manzanares El Real, Madrid). Los peces se mantuvieron en el animalario del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA) a una temperatura de 14°C con un sistema de agua recirculada, alimentados diariamente con una dieta comercial (Skretting, España) con un fotoperíodo de luz-oscuridad de 12:12 h. El tamaño de los animales fue variable entre experimentos, aunque siempre constante dentro de un mismo ensayo. En todos los casos, antes de proceder a realizar los experimentos, los peces se aclimataron a las condiciones del animalario durante dos semanas, durante las cuales éstos se observaban para descartar posibles signos clínicos previos a los experimentos. El manejo de los animales cumplió en todos los casos con la normativa recogida en “Guidelines of the European Union Council” (86/609/EU) para el uso de animales de laboratorio.

#### 3.2. Administración intramuscular de vacunas ADN

Para determinar la inmunogenicidad de las vacunas ADN frente a VHSV en las que se introdujeron los fragmentos CpG, así como estudiar los efectos inmunes de las vacunas ADN frente a VHSV e IHNV en el músculo, la vacunación ADN se realizó por vía intramuscular utilizando en todos los casos 1 µg de cada una de las construcciones por pez. Después de la vacunación de los animales, en ningún caso se observaron efectos adversos como decoloración de la piel o necrosis muscular.

Para analizar las diferentes respuestas inmunes de la vacuna original frente a VHSV en comparación con las construidas insertando los fragmentos CpG, los peces fueron divididos en 5 grupos que fueron inyectados intramuscularmente bien con 100 µl de PBS, 100 µl de PBS que contenía 1 µg del plásmido vacío de la vacuna (pMCV1.4) o 100 µl de PBS que contenían 1 µg de cada una de las construcciones de las vacunas: tanto la pVHSV original (pMCV1.4-G) como las vacunas modificadas con CpGs (pVHSV-2CpG y pVHSV-4CpG). A días 2, 7 y 14 post-vacunación, se sacrificaron cinco animales de cada grupo

mediante sobredosis con MS-22 (Sigma). En estos momentos, se recogió el bazo y un trozo de músculo rodeando el área del pinchazo. Además, a día 30 post-vacunación, se sacrificaron de nuevo cinco truchas de cada grupo de la misma forma para extraer sangre de la vena caudal con una aguja de calibre 25. La sangre se dejó coagular durante toda la noche a 4°C, y al día siguiente se centrifugó durante 10 min a 1600 x g para aislar el suero de cada muestra. Los sueros fueron almacenados a -70°C hasta que se utilizaron para analizar la producción de anticuerpos totales y la presencia de anticuerpos neutralizantes frente al virus.

En el caso del experimento realizado para comparar la respuesta local de quimioquinas inducida por dos vacunas ADN frente a rabdovirus en el músculo, los peces fueron divididos en cuatro grupos que fueron inyectados intramuscularmente con 50 µl de suero salino al 0,9% o la misma cantidad de suero salino en la que se encontraba 1 µg de los diferentes plásmidos: bien el plásmido control, pVHSV o pIHNV. A días 1, 3, y 6 post-vacunación, se sacrificaron seis animales de cada grupo mediante sobredosis con MS-222 y se recogió el músculo que rodeaba el área del pinchazo de cada uno de los individuos para la posterior extracción del ARN y/o microscopía óptica.

### 3.3. Administración oral de vacunas ADN

Los peces fueron divididos en nueve grupos de 150 peces cada uno, en función de los tratamientos que iban a recibir, y designados con las letras de la A hasta la I, siguiendo la correspondencia que se cita a continuación:

-Grupo A: peces inyectados intramuscularmente con 30 µl que contenían 1 µg del plásmido vacío correspondiente.

-Grupo B: peces inyectados intramuscularmente con 30 µl que contenían 1 µg de la vacuna ADN frente a VHSV.

-Grupo C: peces inyectados intramuscularmente con 30 µl que contenían 1 µg de la vacuna ADN frente a IHNV.

-Grupo D: peces a los que se les administró oralmente 50 µl de alginatos vacíos.

-Grupo E: peces a los que se les administró oralmente 50 µl que contenían la cantidad de alginatos correspondiente a 1 µg de la vacuna ADN frente a VHSV.

-Grupo F: peces a los que se les administró oralmente 50 µl que contenían la cantidad de alginatos correspondiente a 10 µg de la vacuna ADN frente a VHSV.

## MATERIALES Y MÉTODOS

-Grupo G: peces a los que se les administró oralmente 50  $\mu$ l que contenían la cantidad de alginatos correspondiente a 10  $\mu$ g del plásmido vacío correspondiente.

-Grupo H: peces a los que se les administró oralmente 50  $\mu$ l la cantidad de alginatos correspondiente a 10  $\mu$ g de la vacuna ADN frente a IHNV.

-Grupo I: peces sin tratamiento. Este último grupo constaba solamente de 6 peces.

En el caso de los tratamientos orales, éstos se suministraron por alimentación forzada. A día 3, 7, 14 y 21 post-vacunación se recogió el intestino posterior de seis peces de cada grupo para la posterior extracción de ARN, exceptuando los peces de los grupos C y H, correspondientes a las vacunas frente a IHNV. En estos grupos, se sacrificaron 6 peces cada día de muestreo, con el objetivo de que las condiciones a la hora de realizar el desafío fueran lo más similares posibles entre los grupos a estudiar. Además, se recogió el intestino anterior y los ciegos pilóricos de los grupos G, H e I (este último solamente el día 3), con el objetivo de observar la correcta absorción y posterior expresión de la vacuna en el tracto intestinal. Estos ensayos se realizaron tanto por inmunohistoquímica como por PCR.

Además, a día 42 post-vacunación, se extrajo la sangre de seis peces de los grupos B (1  $\mu$ g de pVHSV i.m.), E (1  $\mu$ g de pVHSV oral), F (10  $\mu$ g de pVHSV oral) y G (plásmido vacío 10  $\mu$ g oral), para el posterior aislamiento de los sueros. Asimismo, se recogieron los sueros de seis peces de estos grupos a día 52 (8 semanas). Los sueros fueron almacenados a -80°C hasta que se usaron para analizar la producción de anticuerpos después de la vacunación y la presencia de anticuerpos específicos del virus.

Por último, se realizó el desafío con VHSV 0771 por baño, utilizando  $1 \times 10^5$  virus por ml con 90 peces divididos en 3 tanques de 30 peces cada uno, para observar la protección conferida para cada una de las construcciones vacunales.

### 3.4. Administración intraperitoneal de VLPs de IPNV

Para determinar los posibles efectos inmunes en respuesta a la administración intraperitoneal de VLPs de IPNV en trucha arcoíris, los peces fueron divididos en dos grupos. Uno de los grupos fue inyectado intraperitonealmente con 50  $\mu$ l de PBS y el otro con una suspensión de VLPs a una concentración de  $1 \times 10^5$  partículas por pez. En algunos experimentos, se incluyó un grupo inyectado intraperitonealmente con la misma cantidad de virus vivo ( $1 \times 10^5$  partículas por pez). En ningún caso se observaron efectos adversos por la

vacunación tales como decoloración de la piel o necrosis después de la inyección. A días 1, 3, 6, y 8 post-vacunación, cinco truchas de cada grupo fueron sacrificadas por sobredosis a MS-222 para extraer el bazo. A días 21 y 30 después de la vacunación, se sacrificaron tres peces control y nueve vacunados y se extrajo la sangre de la vena caudal utilizando una jeringuilla de calibre 25.

## **4. Evaluación de la respuesta inmune inducida por las vacunas**

### **4.1. Transcripción de genes inmunes**

#### **4.1.1. Aislamiento de ARN**

El ARN total se extrajo de los tejidos o células utilizando Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones recomendadas por la casa comercial. Los tejidos se homogeneizaron en 1 ml de Trizol en hielo, mientras que las células se centrifugaron para retirar el medio antes de resuspender las células directamente en Trizol (1 ml/pocillo). En cualquier caso, las muestras con Trizol se incubaron 5 min a temperatura ambiente para posteriormente mezclar vigorosamente con 200  $\mu$ l de cloroformo. La suspensión se incubó 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 15 min a 12000 x  $g$  a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió la fase acuosa resultante y se depositó en un nuevo tubo. Después de añadir 500  $\mu$ l de isopropanol, se mezcló por inversión y las muestras se mantuvieron a -20°C un mínimo de 30 min para mejorar la precipitación del ARN. Después se centrifugó durante 10 min a 7500 x  $g$  a 4°C. El precipitado de ARN se lavó dos veces con 75% de etanol y se secó a temperatura ambiente o bien por calentamiento a 65°C durante 2 min. Por último, el ARN precipitado se resuspendió por calentamiento a 65°C durante 2 min en agua milliQ estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). En todos los casos, el ARN extraído se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) y se conservó a -80°C hasta su uso.

En el experimento en el que se evalúa la respuesta inmune local tras la administración oral de vacunas ADN, el ARN de los diferentes órganos recogidos fue extraído mediante el kit Rneasy mini (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante, cuantificado con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) y conservado igualmente a -80°C



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.2. Eliminación del ADN genómico contaminante

Las muestras de ARN destinadas a realizar PCR a tiempo real fueron tratadas con DNAsa I para retirar posibles trazas de ADN genómico que pudieran interferir en las posteriores reacciones de PCR en las que se evalúa transcripción de genes inmunes. El tratamiento se llevó a cabo mediante el kit RQ1 RNase-free DNase (Promega) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El ARN se incubó durante 30 min a 37°C con la DNAsa (1 µl por µg de ARN tratado) en tampón de reacción 1x (400 mM Tris HCl pH 8, 100mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>). Al finalizar, la reacción se detuvo con la adición de 1 µl de solución comercial de stop (20mM EGTA, pH 8) y posterior calentamiento a 65°C durante 10 min. El volumen total resultante del tratamiento fue de 12 µl por muestra, a partir del cual se llevó a cabo la creación de ADNc directamente.

### 4.1.3. Producción de ADNc

La síntesis de ADNc a partir de las muestras de ARN para PCR a tiempo real se realizó utilizando la transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen). El volumen de 12 µl de ARN procedente del tratamiento con la DNAsa se incubó con 1 µl de oligo (dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg/ml) y 1 µl de dNTP (10 mM) a 65°C durante 5 min seguido de 1 min en hielo, tras lo cual se añadió una mezcla con 4 µl de tampón 5x (250mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl DTT (0,1 M) y 1 µl de la enzima Superscript III y se incubó durante 1 h a 50°C. La reacción se detuvo calentando a 70°C durante 15 min. El ADN resultante fue diluido a la concentración deseada en agua milliQ estéril y conservado a -20°C hasta su utilización.

### 4.1.4. PCR a tiempo real

La evaluación de los niveles de transcripción de los diferentes genes se realizó mediante PCR a tiempo real en un Mx3005PTM qPCR (Stratagene) utilizando SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems). Para ello 2,5 µl de ADNc se mezclaron con 5 µl del SYBR Green PCR Core Reagents y 2,5 µl de una mezcla de primers a una concentración final de 0,125 µM cada uno. Para la amplificación, esta mezcla se incubó durante 10 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de amplificación (30 s a 95°C y 1 min a 60°C) y un ciclo de disociación (30 s a 95°C y 1 min a 60°C). Todas las amplificaciones se realizaron por

duplicado para confirmar los resultados. Como control negativo de todas las PCRs, se incluyó siempre un pocillo conteniendo únicamente mezcla de reacción sin ADNc.

La expresión génica obtenida para cada gen fue normalizada en relación a la expresión del gen endógeno EF-1 $\alpha$  (factor de elongación 1 $\alpha$ ) en cada muestra expresándose como  $2^{-\Delta Ct}$  (donde  $\Delta Ct$  es determinada como la diferencia entre el valor de Ct del gen en cuestión y el valor de Ct del EF-1 $\alpha$ ) tal como se ha descrito previamente (Cuesta and Tafalla, 2009). Los primers utilizados se diseñaron a partir de secuencias disponibles en la base de datos del GenBank utilizando el software Oligo Perfect de Invitrogen.

Gen	Nº de acceso	Oligonucleótidos (5' → 3')
EF-1 $\alpha$	AF498320	F: GATCCAGAAGGAGGTCACCA R: TTACGTTTCGACCTTCCATCC
IL-8	AJ279069	F: ATTGAGACGGAAAGCAGACG R: CTTGCTCAGAGTGGCAATGA
$\gamma$ -IP	AJ417078	F: TGGACTGGTGAACCGTGTTA R: TCTTGGCAAATGGAGCTTCT
CXCd	DQ191448 (1) DQ191448 (2)	F: GCTCACACTGCTCTAAGGAAGAA R: GGAGAGAGTCTCAATGGAACGT
CK1	AF093802	F: GATGGCTGAAAGGCTACACC R: TGGGATTGTTCTCCTGACG
CK3	AJ315149	F: AGATCACCGTTCCCATCATC R: GTGACTTTCTGGCCATCTCC
CK5B	CA374135	F: TTTGCTGATCGTCAGATACCC R: GTGTCTGCTCCCAGACTTC
CK6	CA355962 (A) CA355812 (B)	F: TGAAAGGCCTACGAATCTGC R: GTTGTGTTGGCTGGTTGTG
CK7A	CA343117	F: CCGAGAATCCCTCTTCAACA R: TCATCGTCGTCTTGGCAGTA
CK9	CA378686	F: GGCTCTTATGGGAAGTCTG R: CTGGGATTGGCACAACAG
CK10	CA361535	F: ATTGCCAAGATCCTCTTCTGTGTT R: CCTGAGGCTGGTAACCTATGACAAC
CK11	BX072681	F: CCTTGAGCATACTAATGCGAGTGG R: GTCTGCACAATACTTCTCCATTG
CK12	CA358073 (A) CA346383 (B)	F: GACATCGATGCCACTGTGTT R: GGAGATGGTTCGCTCCAGAC

Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados para llevar a cabo las PCRs a tiempo real de los distintos genes estudiados incluyendo sus correspondientes números de acceso en el GenBank.

Gen	Nº de acceso	Oligonucleótidos (5' → 3')
Mx	U30253, U47945, U47946	F: AGCTCAAACGCCTGATGAAG R: ACCCCACTGAAACACACCTG
IFN-g	AJ616215	F: GAAGGCTCTGTCCGAGTTCA R: TGTGTGATTTGAGCCTCTGG
IFN2	AJ582754	F: AGTTCCTGTGTATCACCTGTCTG R: GATGCTCAGTACATCTGTCCCA
CD4	AY973028	F: CCTGCTCATCCACAGCCTAT R: CTTCTCCTGGCTGTCTGACC
CD8	AF178053	F: AGTCGTGCAAAGTGGGAAAG R: GGTGCAATGGCATAACAGTG
IgM	S63348	F: TGCCTGTTTGAGAACAAAGC R: GACGGCTCGATGATCGTAAT
IgT	AY870265	F: AACATCACCTGGCACATCAA R: TTCAGGTTGCCCTTTGATTC
CD83	AY263797.1	F: GCTGTTGATAGCGGGAGGTA R: TGTGGACTCAAGGCAATCTG
TLR9	FJ594277	F: GGCTTTTCTCTCTCCATGCTT R: TGCATGTTATCCAACCTTTCA

Tabla 2. Continuación.

#### 4.2. Actividad neutralizante del suero

Para evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a VHSV en el suero de los animales vacunados, se utilizó un ensayo neutralización previamente descrito (Chico *et al.*, 2009). Para ello, 10 µl de diluciones 1:5 de cada uno de los suero de trucha en medio de cultivo (Opti.Mem, Invitrogen) comenzando con la dilución 1:10, se mezclaron con 1,5 µl de complemento de trucha en placas de 96 pocillos. La mezcla se mantuvo 30 min a 14°C para entonces añadir a cada pocillo 50 µl de una dilución de VHSV ajustada a  $1 \times 10^4$  unidades formadoras de placas (p.f.u). Después de 2 h de incubación a 14°C, cada mezcla de virus-suero-complemento se añadió a monocapas de células EPC, crecidas en placas de 96 pocillos, en un volumen final de 60 µl por pocillo. Después de 2 h de adsorción a 14°C, se lavaron las células infectadas, se añadió medio de cultivo de células fresco (RPMI Dutch modificado) suplementado con 2% de FCS y las placas se incubaron durante 24 h a 14°C.

Los sueros recogidos de los animales correspondientes al experimento de vacunación oral frente a VHSV, fueron analizados también para evaluar la respuesta de anticuerpos con el este mismo método, exceptuando el hecho de que las diluciones del plasma fueron 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320, y fueron realizadas por duplicado.

Para evaluar la infectividad de VHSV, las monocapas de células EPC se fijaron durante 10 min en metanol frío y se secaron al aire. Se añadió el anticuerpo monoclonal (Mab) 2C9, específico para la proteína N de VHSV diluido 1000 veces en buffer de dilución (0,24 mM mertiolato, 5 g/l de Tween 20, 50 mg/l de rojo fenol en PBS, pH 6,8) en los pocillos (100 µl por pocillo) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavarlas con agua destilada, se añadieron 100 µl por pocillo de anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón ligado a peroxidasa (Nordic), y la incubación continuó durante 30 min. Después de tres lavados por inmersión en agua destilada, se añadieron 50 µl a cada pocillo de diaminobenzidina (DAB) (Sigma) a 1mg/ml, en PBS con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lorenzo *et al.*, 1996) y la reacción se dejó continuar hasta que se detectaron focos marrones bajo un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-U, Nikon Instruments Inc.). Una vez lavados y secados al aire, los focos marrones de las células teñidas con DAB (focos de células infectadas con VHSV) se contaron con un microscopio invertido con una cuadrícula 10x. Los resultados se expresaron como la inhibición de la infectividad de VHSV mediante la fórmula:  $100 - (\text{n}^\circ \text{ de focos positivos para DAB en los cultivos inoculados con suero de trucha, complementados y VHSV} / \text{n}^\circ \text{ de focos positivos para DAB en cultivos inoculados con suero de trucha y VHSV en ausencia de complemento} \times 100)$ .

Para evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a IPNV en el suero de los animales vacunados, se siguió el método descrito previamente (de las Heras *et al.*, 2010). En este caso, se prepararon diluciones dobles seriadas de los sueros obtenidos de los animales en estudio. A cada una de las diluciones de suero se le añadió igual volumen de una dilución de virus IPNV Sp para obtener a una concentración final de 100 TCID<sub>50</sub>/ml. Se dejaron controles de células sin virus y controles de células con virus sin suero. Las mezclas se incubaron una hora a 20°C y a continuación se inocularon células BF-2 semi-confluentes con 100 µl por pocillo de la mezcla de suero-virus en placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 20°C hasta que se observaron ECP del 100% en los controles de virus. Las células se tiñeron con cristal violeta al 1% en etanol, se lavaron con agua, se dejaron secar, se observaron al microscopio y se determinó el título de neutralización expresándolo como el valor recíproco de la dilución mayor del suero que fue capaz de reducir en un 50% la infectividad viral (TCID<sub>50</sub>/ml) en relación a los controles negativos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.3. Proliferación linfocitaria

#### 4.3.1. Aislamiento de leucocitos de sangre periférica

Los leucocitos totales de sangre periférica de trucha se aislaron siguiendo el método previamente descrito (Graham , 1988). La sangre se extrajo de la vena caudal utilizando una aguja heparinizada y se diluyó 10 veces con medio Leibovitz (L15, Invitrogen) suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomicina, 10 unidades/ml de heparina y 2% de FCS. Estas suspensiones se colocaron encima de colchones de densidad de Percoll al 51% que fueron centrifugados durante 5 min a  $500 \times g$  en medio L-15 con un 0,1% de FCS. La concentración de células viables se determinó mediante la exclusión con azul tripan al 0,4%. Las células se resuspendieron en L-15 con el 10% de FCS en una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml.

#### 4.3.2. Proliferación linfocitaria

Para estudiar si las VLPs de IPNV estimulaban la proliferación linfocitaria de los linfocitos de trucha, éstos se distribuyeron en placas de 96 pocillos a una concentración de  $1 \times 10^6$  células por ml, incubándose con diferentes cantidades de VLPs ( $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^3$  VLPs/ml) a  $20^\circ\text{C}$  durante dos días. Después de esta incubación, se estimó la proliferación celular utilizando el kit CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello se añadieron 50  $\mu\text{l}$  del reactivo a cada pocillo y se incubaron las células durante unas 24 h adicionales. Pasadas las 24 h, se estimó la proliferación linfocitaria de cada pocillo mediante la absorbancia a 490 nm en un lector Fluostar Omega microplate reader (BMG Labtech).

### 4.4. Obtención de células peritoneales

Para estudiar la naturaleza de los leucocitos peritoneales reclutados tras la administración intraperitoneal de las VLPs frente a IPNV, las truchas se inyectaron intraperitonealmente con  $1 \times 10^5$  VLPs por pez o con la misma concentración del virus IPNV vivo o con el mismo volumen de PBS. A las 24 h después de la inyección, se recogieron las células peritoneales después de la adición de 1 ml de PBS en el peritoneo. Debido a que se obtuvo un número insignificante de células de peritoneo de los peces control; sólo se estudió la naturaleza de las células reclutadas en los peces tratados con partículas virales o el virus vivo. Las células recogidas se centrifugaron durante 15 min a 500

x g para extraer el ARN utilizando el kit PureLink™ RNA MicroKit (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### 4.5. Inmunohistoquímica

En algunos experimentos, se realizaron tinciones específicas para detectar bien la glicoproteína de VHSV o las inmunoglobulinas IgM o IgT. Para ello, las muestras de tejidos frescos se fijaron en solución de Bouin durante 24 h, se embebieron en parafina y se seccionaron a 5 µm. Para la detección de la glicoproteína de VHSV codificada por la vacuna se utilizó una concentración 1:100 del anticuerpo monoclonal 1P1D11 específico para la proteína G del virus, cedido por el Dr. Niels Lorenzen del DTU National Veterinary Institute de Aarhus (Dinamarca) (Lorenzen *et al.*, 1988), mientras que para la detección de IgM e IgT se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-IgM F1-18 y anti-IgT F1-15 cedidos por el Dr. Kurt Buchmann del Departamento de Biología de la Universidad de Copenhague (Dinamarca) a concentraciones 1:30 y 1:25 respectivamente. Las secciones se lavaron en PBT y se expusieron al conjugado anti-IgG de ratón biotinilado (Sigma-Aldrich) en una dilución 1:100 durante 1 h a temperatura ambiente.

Para realizar la detección de las inmunoglobulinas IgM e IgT se siguió el protocolo descrito brevemente a continuación. En primer lugar se desparafinaron las muestras de tejido fresco fijadas mediante 2 baños de 5 min en xileno seguidos de 3 baños de 5 min en etanol al 99%, 2 baños de 5 min en etanol al 96% y un baño de 5 min en agua del grifo. Seguidamente se embebieron las muestras en un baño de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1,5% durante 10 min, con el objetivo de bloquear la actividad de la peroxidasa endógena y se realizó un baño de 5 min en agua del grifo. Posteriormente, se realizó un tratamiento de microondas en tampón TEG pH 9 (5 min, 800W, 5 min 40W), comprobando a lo largo del tratamiento que los bloques seguían cubiertos por el tampón, añadiendo agua si fuera necesario, dejándolos luego 15 min en el tampón. Una vez realizado este procedimiento, se lavaron los bloques mediante un baño de 5 min en agua del grifo y se sumergieron en tampón TBS (Tris Buffered Saline). A continuación se realizó un bloqueo mediante un baño de 10 min en 2% BSA en TBS, se lavaron las muestras dos veces en TBS, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en 1% BSA en TBS con azida y se incubaron durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Después se eliminó el anticuerpo primario mediante 2 lavados en TBS y se incubaron con Envision HRP-labelled polymer anti mouse (Dako K4001) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se lavaron con TBS y agua y

## MATERIALES Y MÉTODOS

después se tiñeron con carbazol filtrado (10 ml de Carbazol en 200 ml de buffer de acetato más 100  $\mu$ l de  $H_2O_2$ ). Seguidamente se lavaron durante 5 min en agua del grifo y se tiñeron con hematoxilina de Mayers, se lavaron una vez más durante 5 min en agua del grifo y 5 min más en un baño con agua desmineralizada.

El protocolo de inmunohistoquímica que se realizó para detectar la glicoproteína viral fue algo diferente. Brevemente, después del desparafinado, las secciones se incubaron durante 30 min en PBS (pH 7,2-7,4) con 5% de BSA (PBT). A continuación, se trataron durante toda la noche a 4°C, con el anticuerpo a la dilución óptima en tampón fosfato salino (PBS) con 1% BSA. Las muestras se lavaron de nuevo con PBT y se incubaron 1 h con avidina conjugada con fosfatasa alcalina a temperatura ambiente en condiciones de humedad. Finalmente, las reacciones inmunohistoquímicas se revelaron con Fast-Red (Sigma-Aldrich) diluido en solución Tris-HCl (pH 7,6) durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con agua destilada, tras lo cual se realizó una contratinción con hematoxilina de Harris durante 30 s. Finalmente, las muestras se lavaron con agua destilada.

Para observar los resultados las muestras se montaron utilizando el montaje acuoso Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium (Dako). Las muestras se examinaron con un microscopio óptico Axiolab (Zeiss), donde la positividad se observó en color marrón para el primer protocolo (detección de IgM e IgT) y en color rojo para la glicoproteína viral. Como controles negativos, siempre se incluyeron en paralelo cortes histológicos sin tratar con los anticuerpos.

## 5. Análisis Estadísticos

En función de los experimentos realizados (número de muestras utilizadas, grupos distintos a analizar, etc.) se llevaron a cabo diferentes análisis estadísticos. De forma general los análisis estadísticos realizados fueron *t*-Student cuando se compararon dos grupos con distribución normal. En los casos en los que se comparaban dos grupos con una distribución no ajustada a la normalidad, se empleó un análisis de comparación de medias no-paramétricas Mann-Whitney. En los casos en los que se compararon varios grupos se realizaron análisis de varianza ANOVA con un posterior análisis de comparación de medias Tukey. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa Microsoft Office Excel 2007. En la mayoría de los casos las diferencias se consideraron significativas con valores de *p* menores de 0,05, y únicamente en algún experimento se valoraron las menores a 0,1.

## **V. RESULTADOS**





## **1. AUMENTO DE LA INMUNOGENICIDAD DE UNA VACUNA ADN MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE MOTIVOS CpG**

### **1.1. Producción de vacunas ADN frente a VHSV mediante la incorporación motivos CpG**

Aunque diversos estudios habían demostrado la capacidad inmunoestimuladora de distintos fragmentos CpG en peces, los estudios siempre se habían realizado utilizando los fragmentos CpG únicamente (por sí solos o introducidos en un plásmido), nunca junto con una vacuna. En este trabajo, por lo tanto, quisimos determinar el efecto de la introducción de distintas copias de un fragmento que contenía 10 motivos CpG en tandem, y que había sido previamente descrito como inmunoestimulante en otras especies de peces (Chen *et al.*, 2007) en la inmunogenicidad de una vacuna ADN. Siguiendo el mismo protocolo descrito por Chen y col. (Chen *et al.*, 2007), a partir de la vacuna original (pVHSV) obtuvimos cuatro vacunas distintas: vacunas ADN frente a VHSV en las que se había introducido 1 copia de este fragmento (pVHSV-1CpG), 2 copias de este fragmento (pVHSV-2CpG), 3 copias de este fragmento (pVHSV-3CpG) o 4 copias de este fragmento (pVHSV-4CpG). Una vez comprobado por análisis de restricción y posterior secuenciación que los plásmidos estaban correctos a nivel de secuencia, se procedieron a realizar los ensayos *in vivo* utilizando la vacuna original en paralelo con pVHSV-2CpG y pVHSV-4CpG.

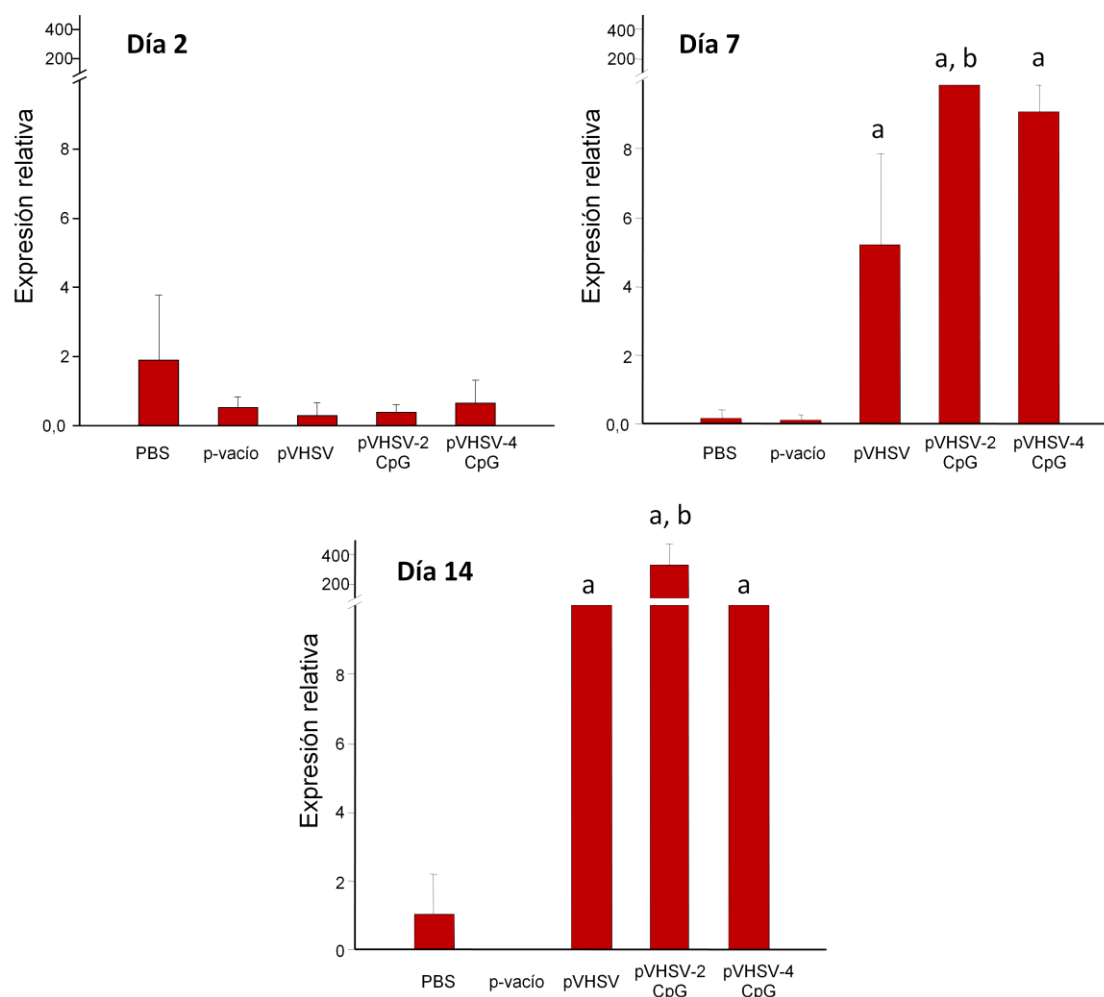
### **1.2. Niveles de transcripción de genes inmunes en músculo**

Con el fin de comparar la respuesta inmune inducida mediante las vacunas modificadas que contenían los fragmentos CpG con la respuesta inmune inducida por la vacuna original pVHSV, determinamos en primer lugar los niveles de expresión del ARN mensajero de diferentes genes inmunes en respuesta a la vacunación intramuscular. Los genes inmunes estudiados habían sido identificados previamente como genes inducidos en respuesta a vacunas ADN en peces, tales como Mx, IFN- $\gamma$ , MHC-I e IL-1 $\beta$  (Chico *et al.*, 2009; Midtlyng, 1997; Zou *et al.*, 2005)

## RESULTADOS

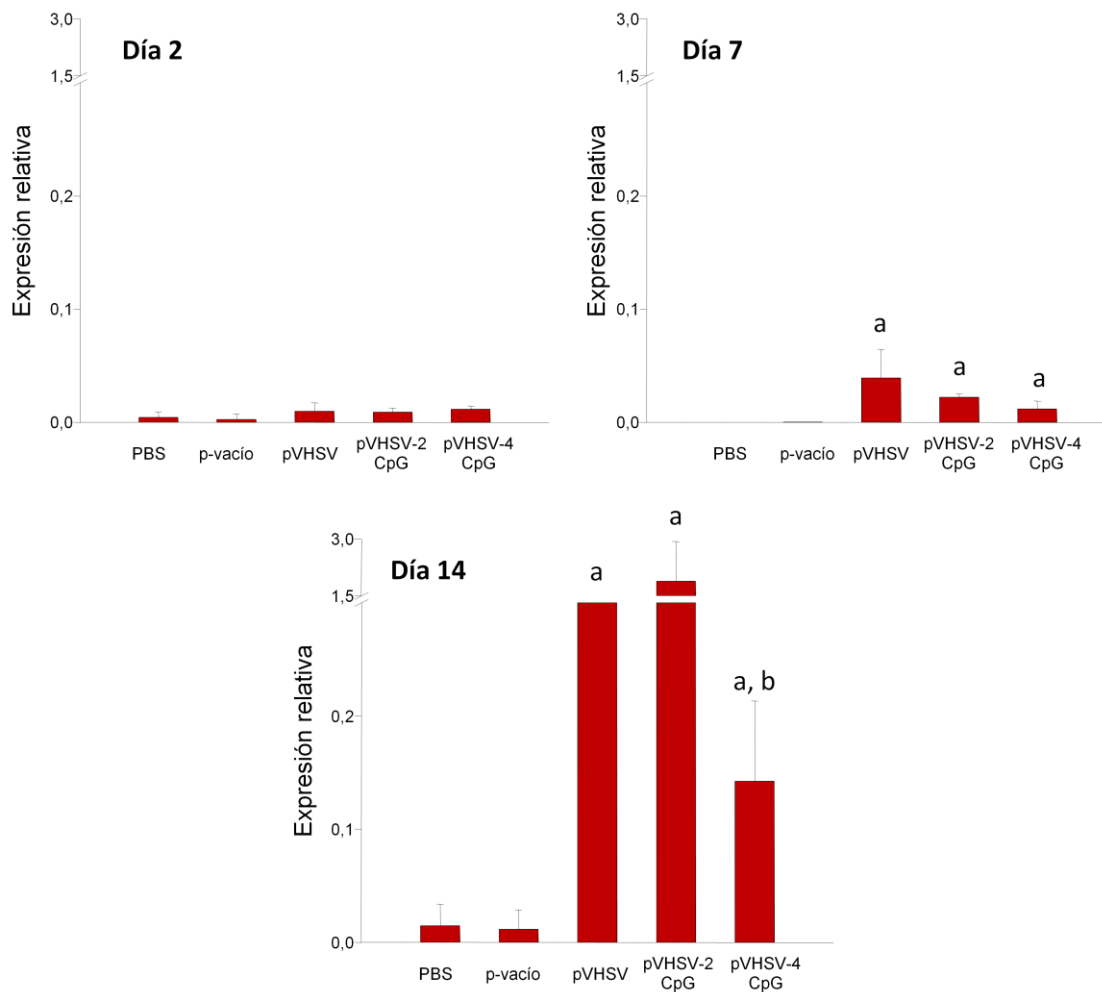
En primer lugar, se estudió el efecto de las distintas vacunas sobre la transcripción de estos genes inmunes en el músculo. En este tejido, los niveles de transcripción de los genes Mx inducibles por IFN de tipo I, aumentaron significativamente en respuesta a pVHSV en comparación con los niveles alcanzados en respuesta al plásmido vacío en el que no se encontraba el gen de la glicoproteína viral (pMCV1.4). Tal como ya se había descrito anteriormente (Chico *et al.*, 2009; Midtlyng, 1997; Zou *et al.*, 2005), esta inducción de la transcripción de Mx en respuesta a la vacuna no se observó hasta el día 7 después de la vacunación (**Figura 6**). Cuando en lugar de utilizar la vacuna original, se vacunaba a los peces con pVHSV-2CpG, los niveles de inducción de Mx aumentaron significativamente, observándose una mayor inducción tanto a día 7 como a día 14 post-vacunación (donde se alcanzaron niveles de expresión de Mx 32 veces mayores que los observados con la vacuna original). Con la vacuna pVHSV-4CpG, sin embargo, los niveles de expresión de Mx fueron similares a los observados en respuesta a pVHSV.

También estudiamos los niveles de transcripción de IFN- $\gamma$  en respuesta a las diferentes vacunas, ya que la expresión de esta citoquina se ha correlacionado con una fuerte respuesta inmune específica de células T (Rhodes *et al.*, 2004). Al igual que ocurrió con los genes Mx, la vacuna pVHSV no provocó una transcripción de IFN- $\gamma$  significativamente más alta que la observada con el plásmido vacío hasta el día 7 post-vacunación (**Figura 7**). En este día, la respuesta provocada por las vacunas CpG modificadas fue más baja, a pesar de que las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, a día 14 post vacunación, los niveles de transcripción de IFN- $\gamma$  fueron significativamente más bajos en el grupo vacunado con la vacuna modificada pVHSV-4CpG que el grupo vacunado con la vacuna pVHSV.



**Figura 6. Transcripción de Mx en el músculo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.** Los niveles de transcripción de Mx total en el músculo se determinaron por medio de PCR a tiempo real a distintos tiempos post-vacunación. Para ello, cada uno de los días se sacrificaron 5 peces de cada grupo: peces control (inyectados con PBS), peces inyectados intramuscularmente con 1  $\mu$ g de del plásmido vacío pMCV1.4 (p-vacío) o peces inyectados con 1  $\mu$ g de las diferentes construcciones vacunales. Los datos se representan como la media de la expresión de los genes relativa a la expresión del gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. Los valores medios con una “a” son significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío, mientras que los valores medios con “b” indican los valores de las vacunas modificadas significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los grupos vacunados con la vacuna original (pVHSV).

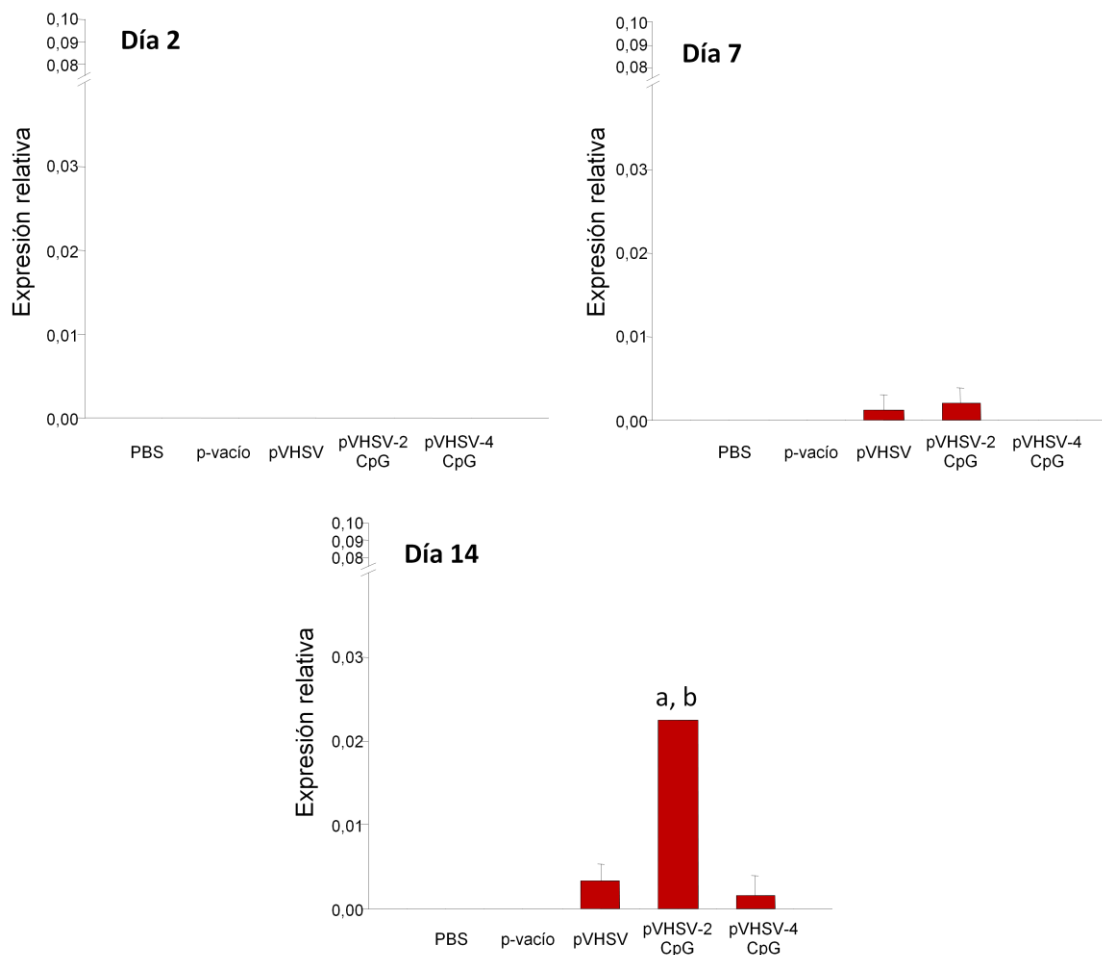
## RESULTADOS



**Figura 7. Transcripción de IFN- $\gamma$  en el músculo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.** Los niveles de expresión de IFN- $\gamma$  en los diferentes grupos de peces se determinó tal como se describe en la leyenda de la Figura 6. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. Los valores medios con una “a” son significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío, mientras que los valores medios con “b” indican los valores de las vacunas modificadas significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los grupos vacunados con la vacuna original (pVHSV).

Una de las principales ventajas de la vacunación con vacunas ADN, se basa en que tras la inyección intramuscular, el plásmido se incorpora y el antígeno se expresa en el interior de las células del músculo y por lo tanto no sólo se expresa directamente en la superficie de las células, sino que también se procesa dentro de ellas y se expone en el contexto de MHC-I simulando una infección real (Lorenzen *et al.*, 2005). Por consiguiente, para evaluar la respuesta inmune provocada por las distintas vacunas ADN producidas, también determinamos sus efectos sobre la transcripción de MHC-I. En el músculo, a pesar de que en nuestro experimento la vacuna original pVHSV no fue capaz de inducir significativamente la transcripción de MHC-I, pVHSV-2CpG sí que desencadenó unos

niveles de transcripción de MHC-I significativamente más altos que pVHSV o el plásmido vacío (**Figura 8**).

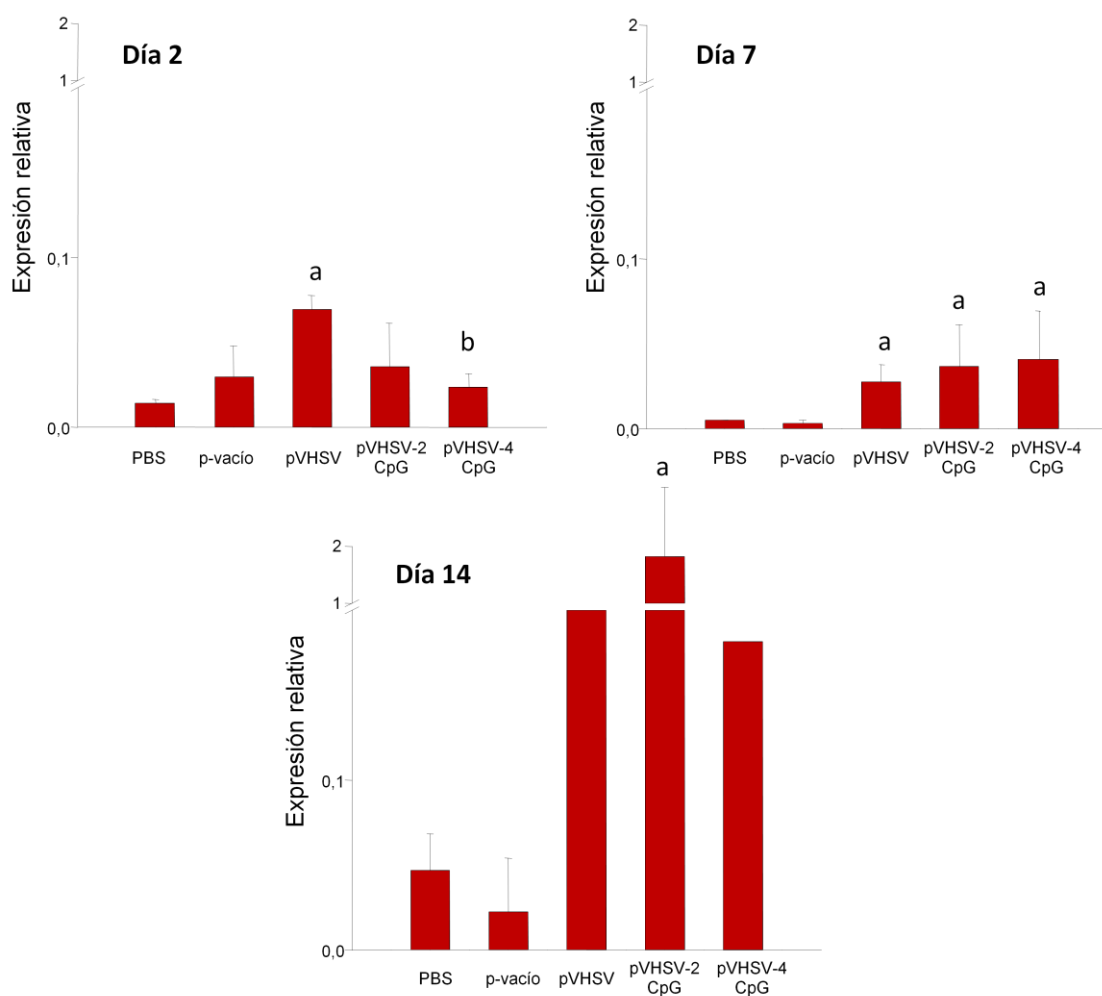


**Figura 8. Transcripción de MHC-I en el músculo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.** Los niveles de expresión de MHC-I en los diferentes grupos de peces fueron determinados como se describe en la leyenda de la Figura 6. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. Los valores medios con una “a” son significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío, mientras que los valores medios con “b” indican los valores de las vacunas modificadas significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los grupos vacunados con la vacuna original (pVHSV).

También se evaluaron los niveles de ARNm de IL-1 $\beta$ , como indicador de la respuesta inflamatoria producida por cada una de las construcciones vacunales. Tal como era de esperar, la vacuna pVHSV indujo, en el músculo, niveles de expresión de IL-1 $\beta$  significativos en comparación con aquellos obtenidos con el plásmido vacío en los días 2 y 7 post-vacunación (**Figura 9**). A día 14, aunque los niveles fueron mayores en los vacunados que en

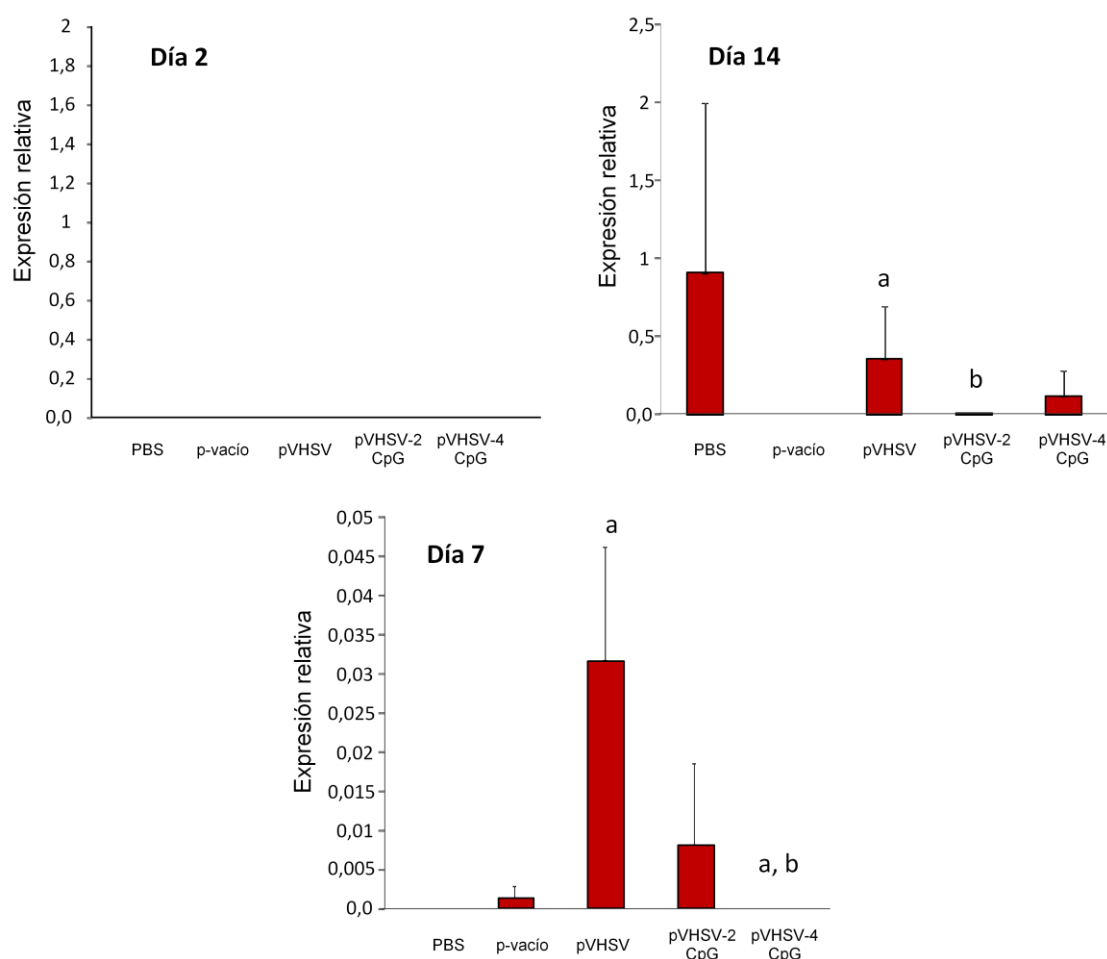
## RESULTADOS

los inyectados con el plásmido vacío, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el caso de las vacunas modificadas con motivos CpG, a día 2 la transcripción de IL-1 $\beta$  fue más baja que en respuesta a pVHSV, con diferencias significativas para pVHSV-4CpG. Estas diferencias no se observaron a día 7 post-vacunación. Sin embargo, se observó un aumento en los niveles de expresión de IL-1 $\beta$  a día 14 post-vacunación con la vacuna pVHSV-2CpG respecto a los niveles observados con pVHSV.



**Figura 9. Transcripción de IL-1 $\beta$  en el músculo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.** Los niveles de expresión de IL-1 $\beta$  en los diferentes grupos de peces fueron determinados como se describe en la leyenda de la Figura 6. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. Los valores medios con una “a” son significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío, mientras que los valores medios con “b” indican los valores de las vacunas modificadas significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los grupos vacunados con la vacuna original (pVHSV).

Por último, se evaluó el efecto de las distintas vacunas ADN en la transcripción del receptor TLR9, homólogo al que en mamíferos es responsable de la detección de motivos CpGs, recientemente descrito en trucha arcoíris (Skjaeveland *et al.*, 2008). En este caso los valores observados fueron muy variables entre los distintos días post-vacunación (**Figura 10**). A día 2 post-vacunación los niveles de transcripción de TLR9 permanecieron indetectables, mientras que a día 7 se observó un ligero aumento en respuesta al plásmido vacío y una transcripción significativamente mayor en respuesta a la vacuna, que se mantuvo a día 14 post-vacunación. Las vacunas que además contenían motivos CpG mostraron sin embargo unos niveles de transcripción muy variables y en general menores a los observados en respuesta a la vacuna original.



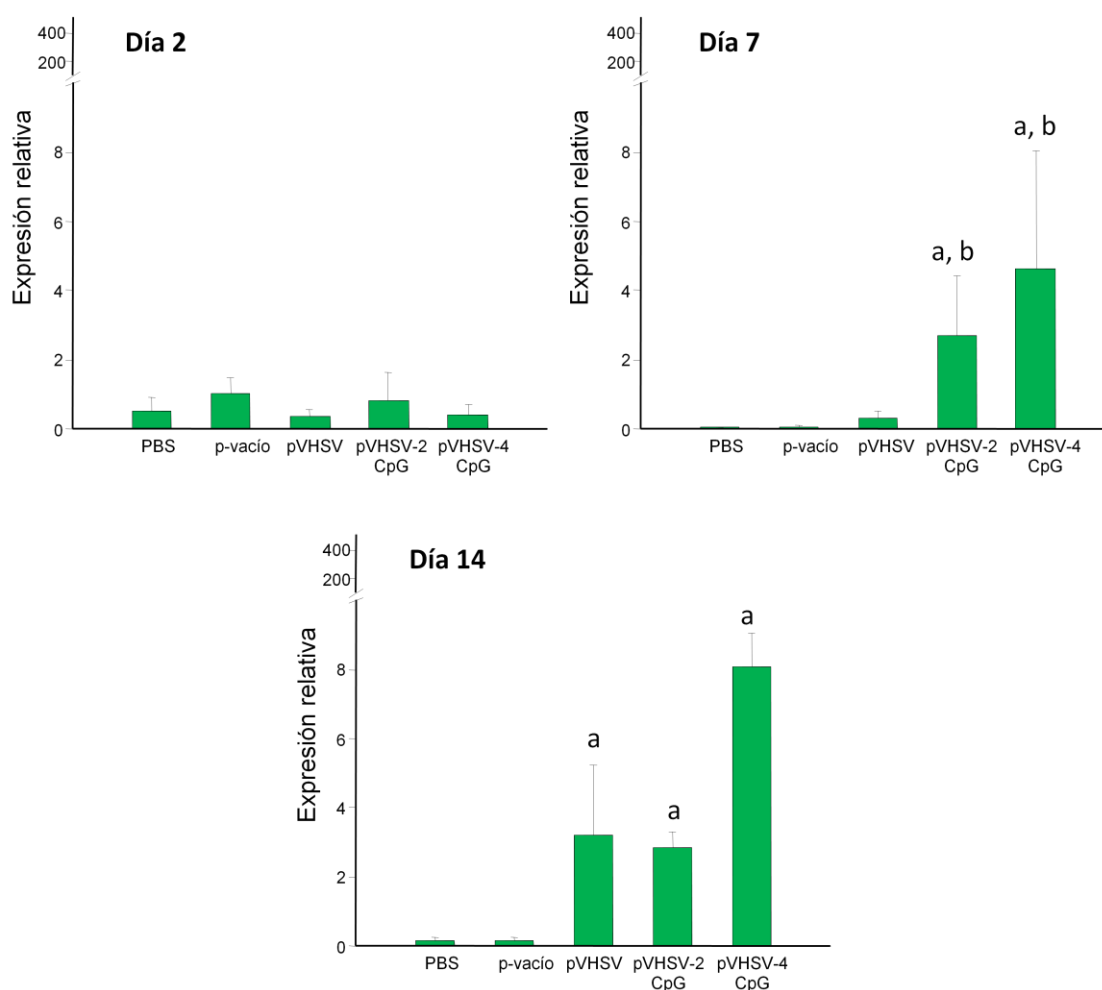
**Figura 10. Transcripción de TLR-9 en el músculo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.** Los niveles de expresión de TLR9 en los diferentes grupos de peces fueron determinados como se describe en la leyenda de la Figura 6. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. Los valores medios con una “a” son significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío, mientras que los valores medios con “b” indican los valores de las vacunas modificadas significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los grupos vacunados con la vacuna original (pVHSV).



## RESULTADOS

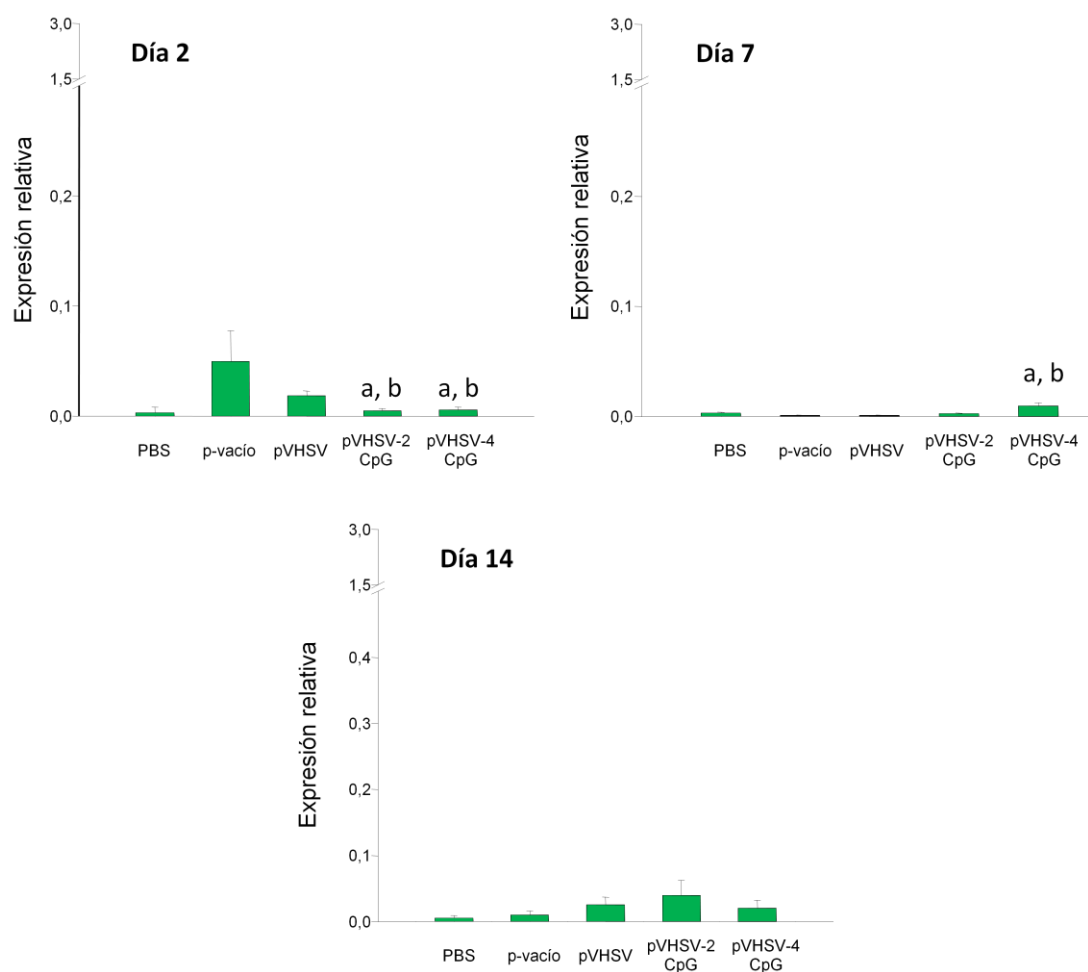
### 1.3. Niveles de transcripción de genes inmunes en bazo

También comparamos los niveles de transcripción de estos mismos genes inmunes en el bazo de peces inyectados con las distintas vacunas. En el bazo, pVHSV no fue capaz de estimular significativamente la transcripción de Mx hasta día 14 post-vacunación (**Figura 11**), mientras que las vacunas modificadas con fragmentos CpG sí estimularon significativamente la transcripción de Mx a día 7 en comparación tanto a pVHSV como al plásmido vacío. A día 14, todas las vacunas indujeron Mx, observándose niveles de transcripción ligeramente más altos en respuesta a pVHSV-4CpG, aunque sin observarse diferencias significativas entre los grupos.



**Figura 11. Transcripción de Mx en el bazo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.** El experimento fue llevado a cabo con la misma metodología descrita en la Figura 6. Los datos se representan como la media de la expresión de los genes relativa a la expresión del gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. Los valores medios con una “a” son significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío, mientras que los valores medios con “b” indican los valores de las vacunas modificadas significativamente diferentes que aquellos obtenidos en los grupos vacunados con la vacuna original (pVHSV).

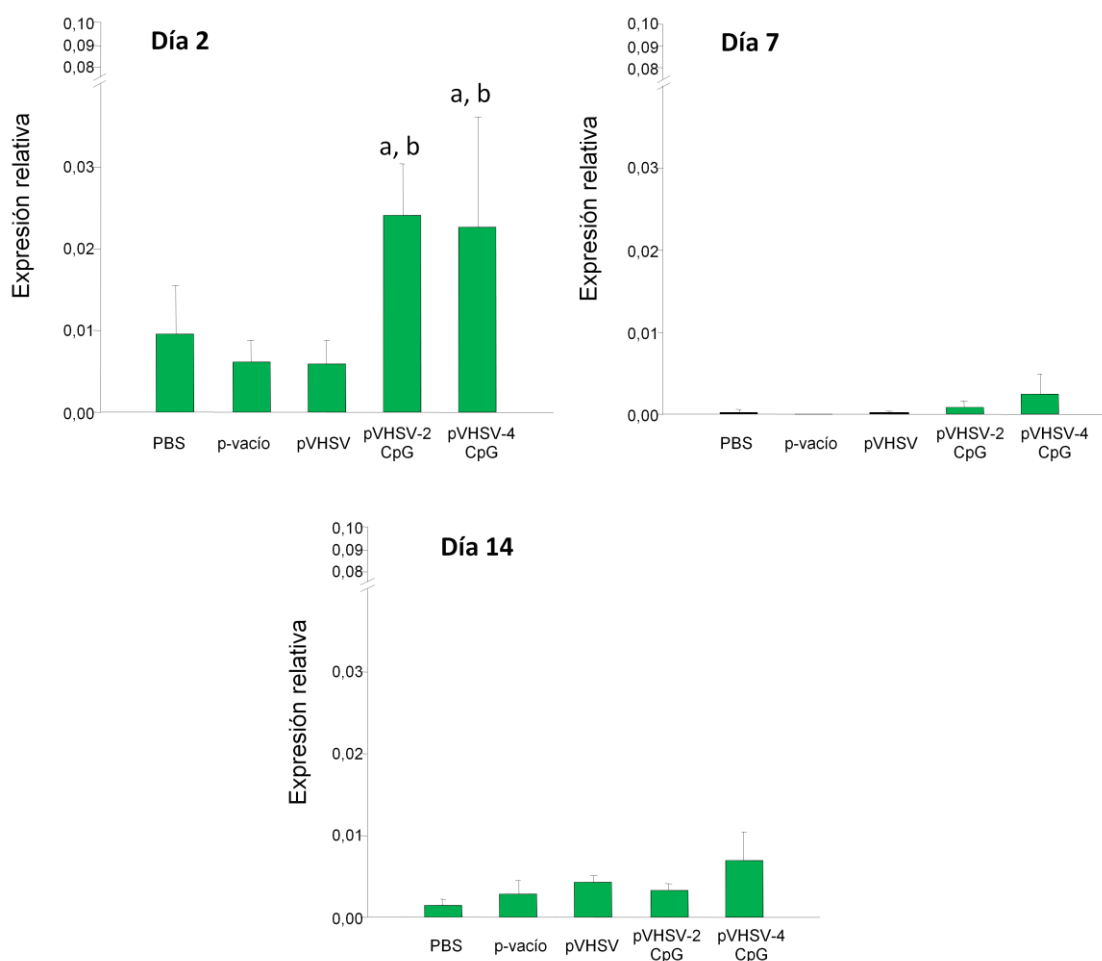
Al igual que ocurría en músculo, también los niveles de transcripción de IFN- $\gamma$  en el bazo fueron significativamente más bajos en el grupo vacunado con pVHSV-4CpG que en el grupo vacunado con pVHSV (**Figura 12**). A día 7, sin embargo, el grupo vacunado con pVHSV-4CpG mostró los valores más altos de transcripción de IFN- $\gamma$ . En cualquier caso, pVHSV no fue capaz de inducir significativamente la transcripción de IFN- $\gamma$  en comparación con aquella observada con el plásmido vacío.



**Figura 12. Transcripción de IFN- $\gamma$  en el bazo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.** Los niveles de expresión de IFN- $\gamma$  en los diferentes grupos de peces fueron determinados como se describe en la leyenda de la Figura 6. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. Los valores medios con una “a” son significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío, mientras que los valores medios con “b” indican los valores de las vacunas modificadas significativamente diferentes que aquellos obtenidos en los grupos vacunados con la vacuna original (pVHSV).

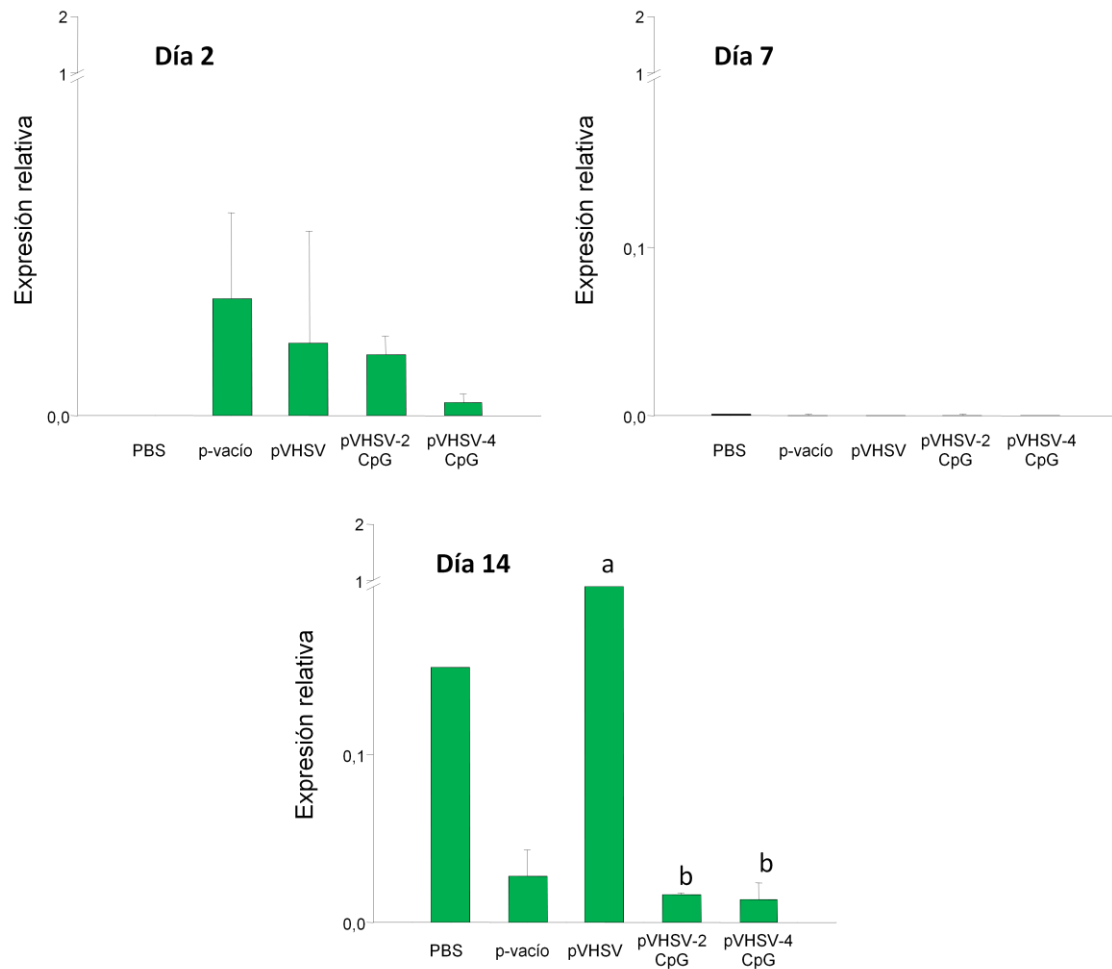
## RESULTADOS

Respecto a los niveles de transcripción de MHC-I en el bazo, a pesar de que pVHSV no provocó un efecto significativo en los niveles de transcripción de estos genes, ambas vacunas modificadas con fragmentos CpG fueron capaces de inducir a día 2 post-vacunación niveles de transcripción significativamente mayores a los observados tanto en el grupo vacunado con el plásmido pVHSV como en el inyectado con el plásmido vacío (**Figura 13**).



**Figura 13. Transcripción de MHC-I en el bazo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.** Los niveles de expresión de MHC-I en los diferentes grupos de peces fueron determinados como se describe en la leyenda de la Figura 6. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. Los valores medios con una “a” son significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío, mientras que los valores medios con “b” indican los valores de las vacunas modificadas significativamente diferentes que aquellos obtenidos en los grupos vacunados con la vacuna original (pVHSV).

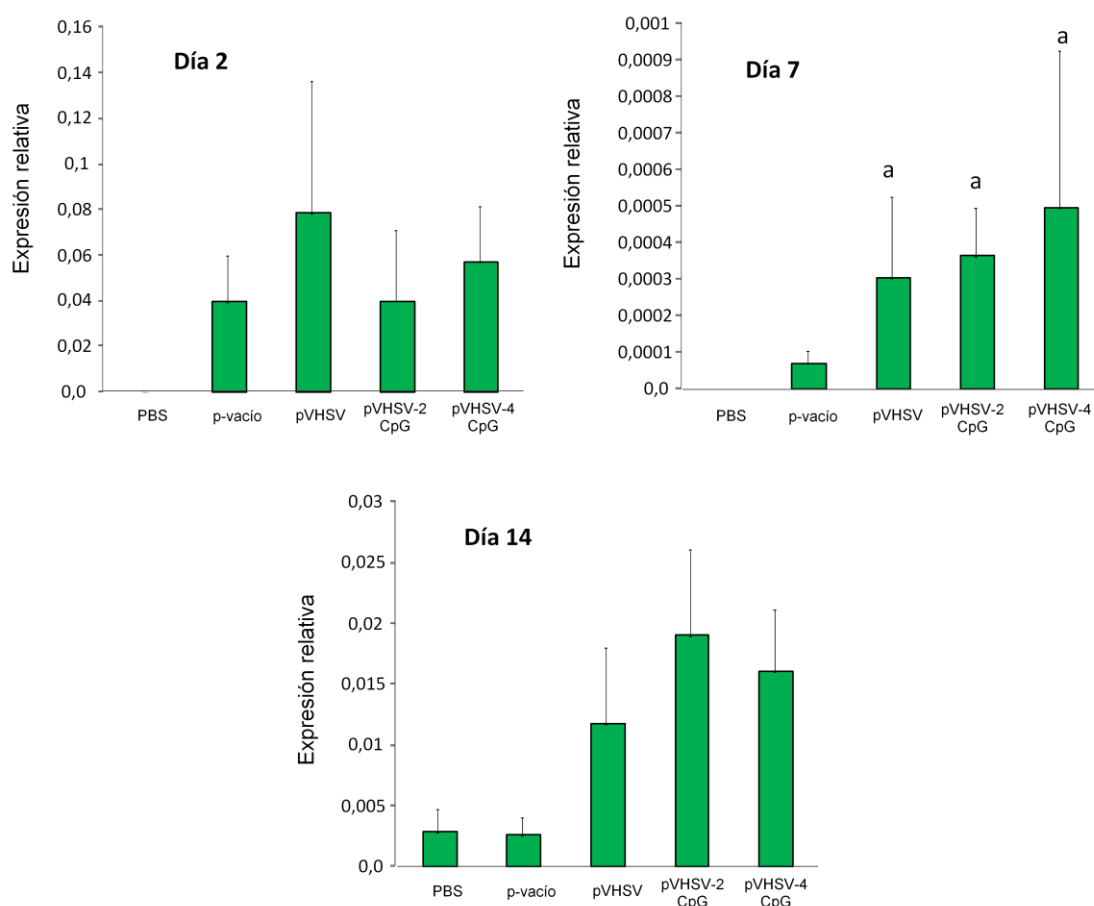
En el bazo, la vacuna pVHSV no fue capaz de inducir niveles significativos de transcripción de IL-1 $\beta$  hasta el día 14 post-vacunación. Sin embargo, en este día, los dos grupos vacunados con las vacunas ADN enriquecidas con los fragmentos CpG mostraron niveles significativamente menores, incluso menores que los observados en los grupos control (**Figura 14**).



**Figura 14. Transcripción de IL-1 $\beta$  en el bazo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.** Los niveles de expresión de IL-1 $\beta$  en los diferentes grupos de peces fueron determinados como se describe en la leyenda de la Figura 6. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. Los valores medios con una “a” son significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío, mientras que los valores medios con “b” indican los valores de las vacunas modificadas significativamente diferentes que aquellos obtenidos en los grupos vacunados con la vacuna original (pVHSV).

## RESULTADOS

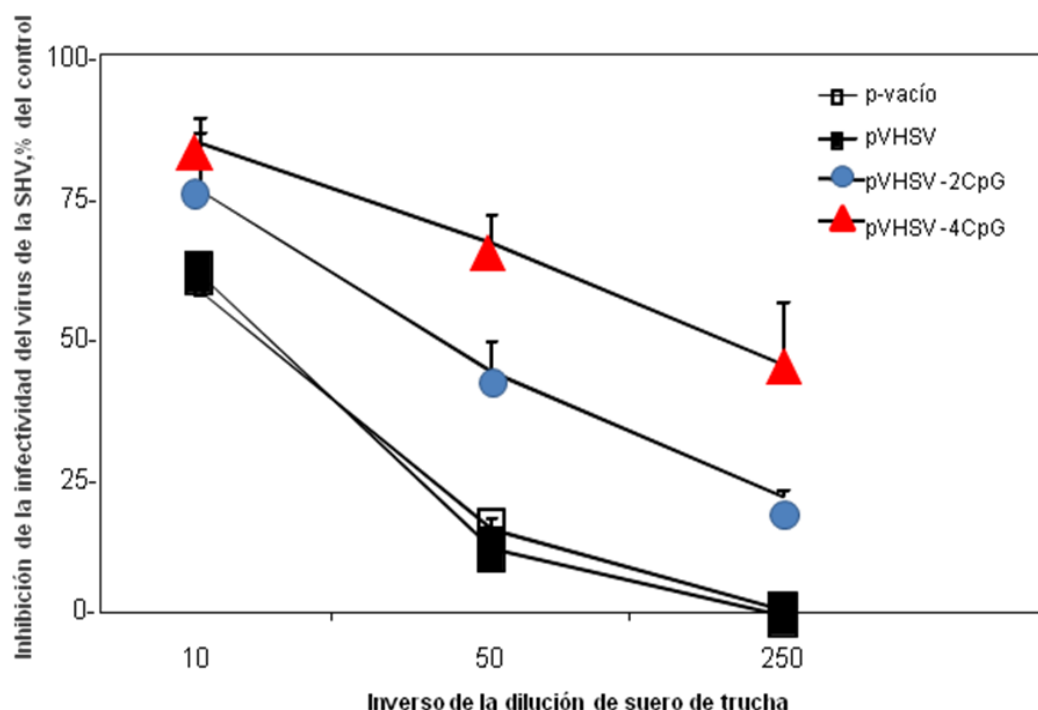
En el bazo, a días 2 y 7 post-vacunación, todos los grupos inyectados con plásmido, incluyendo el plásmido vacío, transcriben TLR9, no detectándose sin embargo en el grupo inyectado con PBS. Mientras que a día 2 post-vacunación no se observan diferencias entre estos grupos, a día 7 post-vacunación los niveles de los grupos vacunados son mayores que los observados en los peces inyectados con el plásmido vacío, manteniéndose esta diferencia a día 14 post-vacunación. La inclusión de motivos CpG aumento ligeramente los niveles de TLR9 especialmente a día 14 post-vacunación, aunque sin llegar a observarse diferencias significativas (**Figura 15**). Estos resultados parecen estar en concordancia con un estudio reciente que sugiere que en el caso de la trucha arcoíris en TLR9 participa más en la detección de la glicoproteína viral codificada en el plásmido que en los motivos CpG presentes en él (Ortega-Villaizan *et al.*, 2011).



**Figura 15. Transcripción de TLR-9 en el bazo de peces inyectados con las distintas construcciones vacunales modificadas mediante motivos CpG.** Los niveles de expresión de TLR9 en los diferentes grupos de peces fueron determinados como se describe en la leyenda de la Figura 6. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. Los valores medios con una “a” son significativamente diferentes a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío, mientras que los valores medios con “b” indican los valores de las vacunas modificadas significativamente diferentes que aquellos obtenidos en los grupos vacunados con la vacuna original (pVHSV).

#### 1.4. Producción de anticuerpos neutralizantes en respuesta a las distintas vacunas

Para comparar la eficacia de cada una de las vacunas construidas y determinar si la introducción de motivos CpG aumenta la inmunogenicidad de las vacunas ADN, también se evaluó la capacidad de las distintas construcciones para producir anticuerpos neutralizantes. Tal y como ocurre con frecuencia en las vacunaciones ADN frente a VHSV y a pesar de su efectividad, los sueros obtenidos de los peces vacunados con pVHSV no mostraron una actividad neutralizante significativa. Sin embargo, se observó una importante inhibición de la actividad infectiva de VHSV en los sueros de los peces vacunados con pVHSV-2CpG y especialmente en aquellos sueros de los peces vacunados con pVHSV-4CpG (**Figura 16**).



**Figura 16. Actividad neutralizante de los sueros de peces vacunados con las distintas construcciones vacunales.** Una cantidad fija de VHSV se incubó con diluciones crecientes de suero de peces vacunados durante 2 h a 14°C, tal como se describe en Materiales y Métodos. Posteriormente, las monocapas de células EPC fueron infectadas con dicha mezcla de virus y suero, para posteriormente evaluar la infectividad del virus. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición relativo al observado en células con virus no expuesto a suero.

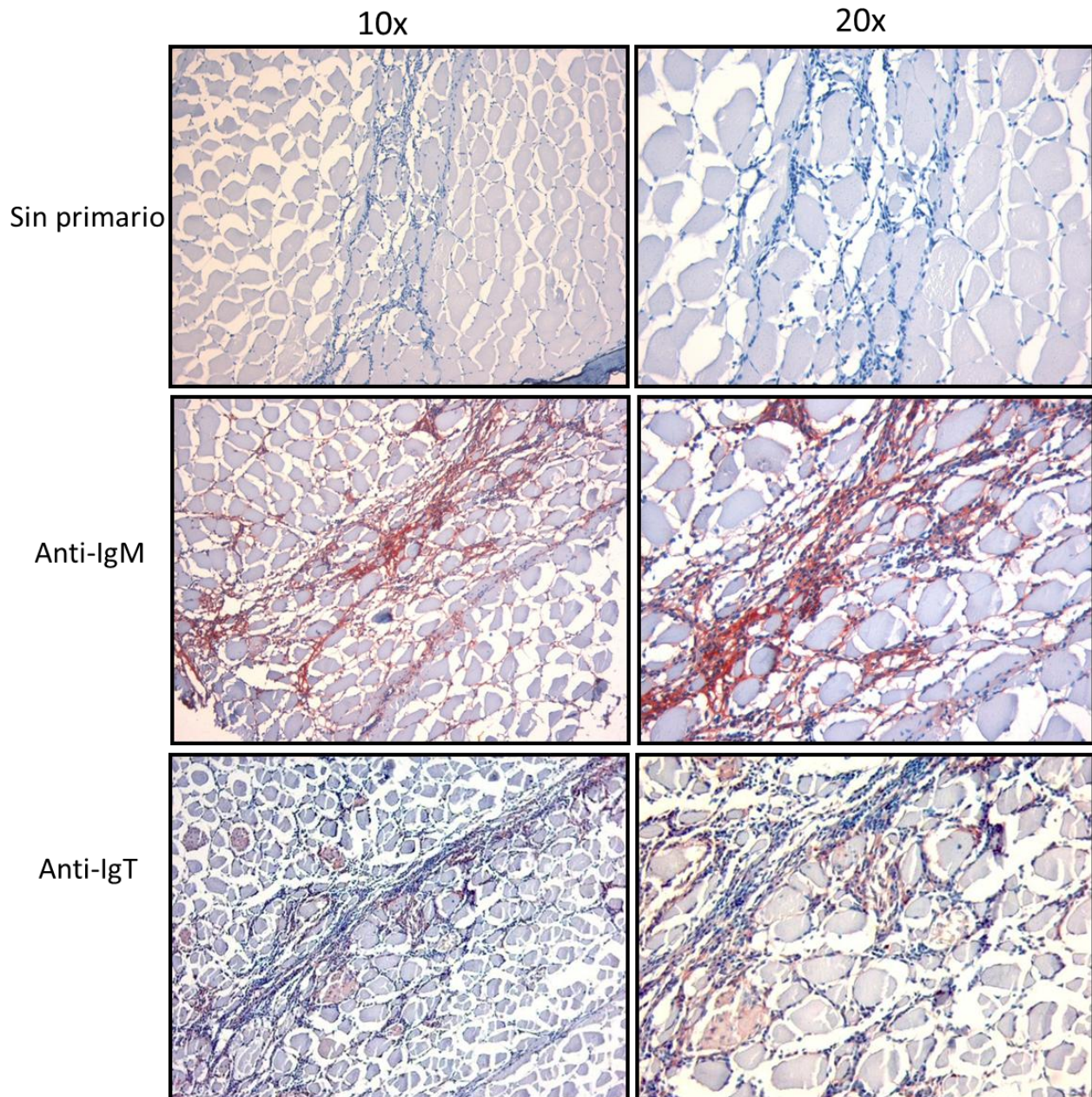
## 2. INDUCCIÓN DE QUIMIOQUINAS EN MÚSCULO EN RESPUESTA A DISTINTAS VACUNAS ADN.

### 2.1. Infiltración en músculo en respuesta a vacunación ADN

Hasta el momento, el único método que ha resultado ser eficaz para la administración de vacunas ADN frente a rabdovirus en peces es la inyección intramuscular. En este capítulo, quisimos por lo tanto profundizar en la infiltración que se produce en el músculo en respuesta a la vacunación, identificando algunas quimioquinas implicadas en el reclutamiento de células inmunes a la zona del pinchazo. Para ello, comparamos los efectos producidos por una vacuna frente a VHSV (pVHSV) con los observados en respuesta a una vacuna equivalente para IHNV (pIHNV) con el fin de establecer también si el antígeno viral juega un papel en las quimioquinas inducidas y por lo tanto en el tipo de infiltración observada.

En primer lugar, utilizando la vacuna ADN frente a VHSV únicamente, por histología, pudimos comprobar, tal y como se había descrito previamente (Lorenzen *et al.*, 2005), que la vacunación ADN provoca una infiltración celular masiva, significativamente mayor a la observada en respuesta al plásmido vacío. Con el fin de caracterizar algo mejor las células infiltradas en el músculo en respuesta a la vacunación, utilizando anticuerpos monoclonales específicos, pudimos determinar que un gran porcentaje de las células infiltradas eran linfocitos IgM<sup>+</sup> y linfocitos IgT<sup>+</sup> (**Figura 17**), algo inesperado en comparación con la infiltración celular que se observa en mamíferos en respuesta a la vacunación ADN (Deng *et al.*, 2005; Shirota *et al.*, 2007).





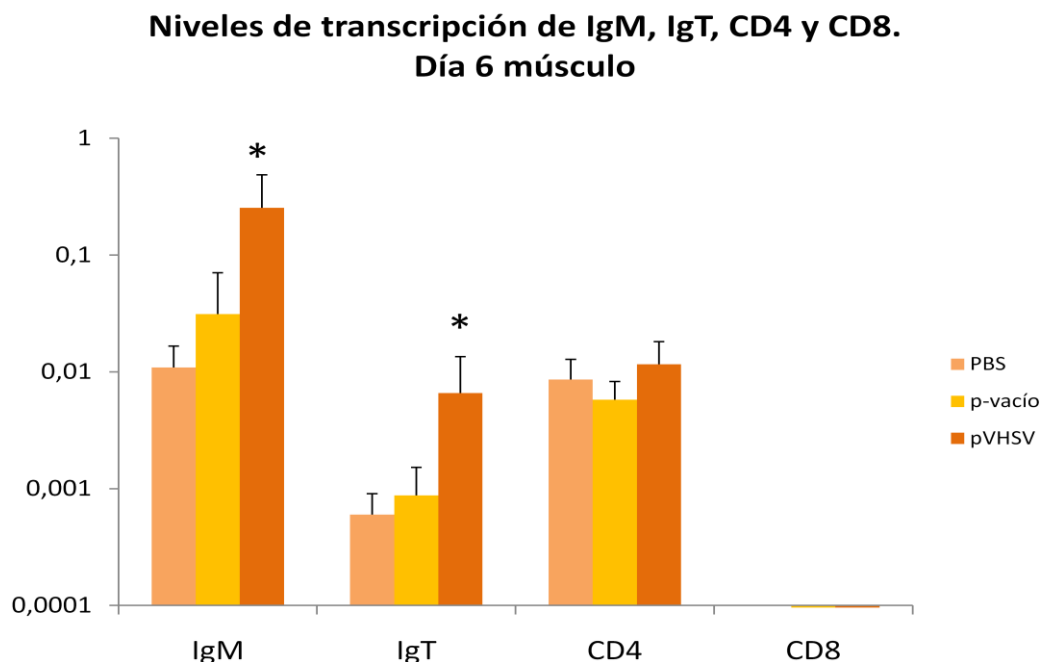
**Figura 17. Inmunohistoquímica de músculo de trucha arcoíris vacunada con pVHSV utilizando anticuerpos monoclonales específicos anti-IgM y anti-IgT de trucha. Fotografías tomadas a 10x y 20x.**

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos por inmunohistoquímica en la que detectamos una gran infiltración de linfocitos B, y así caracterizar mejor las células infiltradas en respuesta a las vacunas ADN, decidimos analizar los niveles de mRNA de algunos genes inmunes marcadores de estos y otros tipos celulares por PCR a tiempo real a día 6 post-inyección. Los niveles de transcripción de IgM e IgT fueron significativamente mayores en el grupo vacunado con pVHSV que en el vacunado con el plásmido vacío, corroborando nuestros resultados previos (**Figura 18**). Los niveles de CD4 también aumentaron respecto a



## RESULTADOS

los observados con el plásmido vacío pero no con respecto a los del PBS, por lo cual estos resultados no se consideraron significativos. Se detectó transcripción de CD8 pero sus valores fueron insignificantes en comparación con el resto de genes analizados.

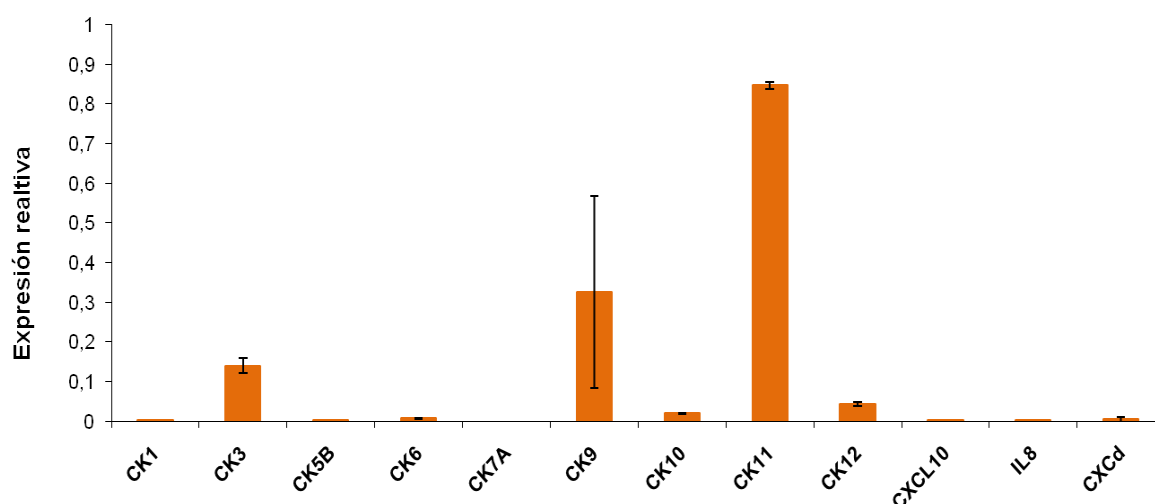


**Figura 18. Niveles de transcripción de IgM, IgT, CD4 y CD8 en músculo después de la vacunación ADN.** Los peces se inyectaron con el plásmido vacío (p-vacío), la vacuna de VHSV (pVHSV) o con el mismo volumen de PBS. A día 6 post-vacunación, se recogió el músculo alrededor de la zona del pinchazo y se evaluó la expresión de los genes inmunes indicados por real-time. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. \* Valores medios significativamente mayores a aquellos obtenidos en los peces control inyectados con el plásmido vacío.

### 2.2. Niveles de transcripción de quimioquinas en músculo en respuesta a la vacunación ADN

Una vez caracterizada a grandes rasgos esta infiltración provocada por la vacuna ADN en la que principalmente se infiltran linfocitos B (tanto IgM<sup>+</sup> como IgT<sup>+</sup>) y células CD4<sup>+</sup>, procedimos a identificar las quimioquinas responsables de esta infiltración comparando en este caso la respuesta inmune inducida en el músculo por la vacuna ADN pVHSV frente a la inducida mediante vacuna pIHNV. Para ello, se determinaron los niveles de expresión del ARN mensajero de diferentes genes de quimioquinas en el músculo, incluyendo la zona de pinchazo todavía visible a los tiempos analizados. Los genes estudiados, en total doce, incluían todas las quimioquinas CXC descritas en trucha arcoíris, así como una quimioquina CC representativa de cada uno de los grupos filogenéticos

establecidos por Peatman y col. (Peatman y Liu, 2007). Además, se recogieron muestras de músculo de truchas sin tratar con el fin de establecer los niveles basales de estas quimioquinas en este tejido. En los peces sin tratar, la CK11 fue la quimioquina que se expresó en mayor medida, seguida de CK9 y CK3 (**Figura 19**). El resto de las quimioquinas o bien no se detectó o lo hizo a niveles muy bajos.

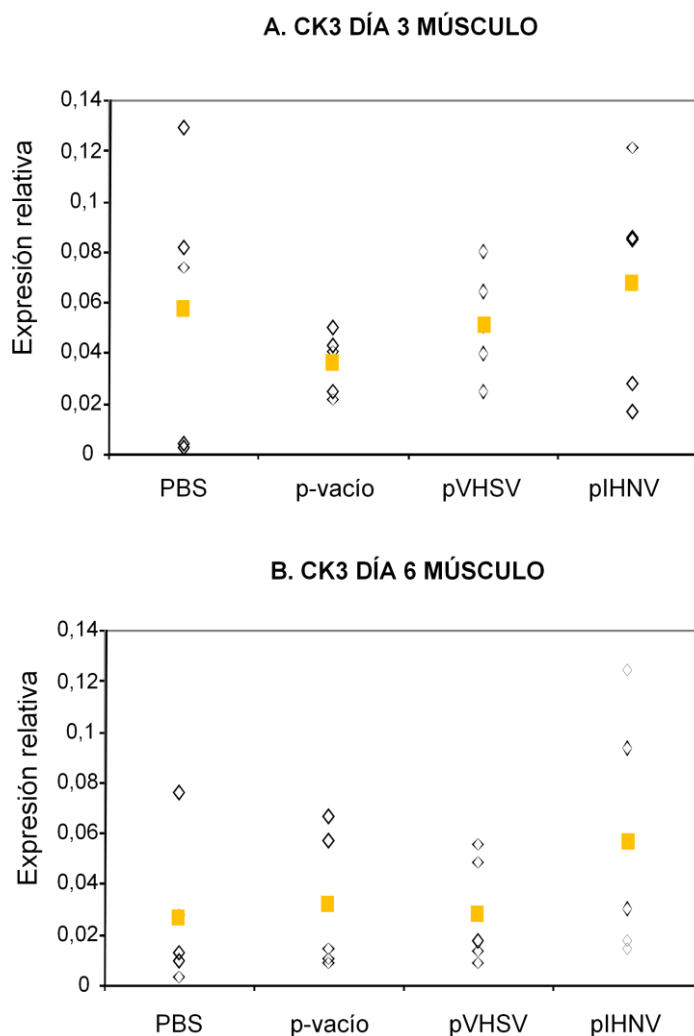


**Figura 19. Niveles constitutivos de transcripción de todas las quimioquinas estudiadas en el músculo de truchas sin tratar.** Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar.

Respecto a los animales inyectados intramuscularmente con los distintos plásmidos, se observó que a día 1 post-vacunación, los valores de transcripción de quimioquinas obtenidos fueron muy variables entre individuos de un mismo grupo, no observándose en ningún caso diferencias significativas en la transcripción de ninguna de las quimioquinas estudiadas entre los grupos vacunados y el grupo control. Por este motivo, decidimos desechar estos valores para posteriores análisis. Por otro lado, para algunas de las quimioquinas, nunca observamos expresión, lo que nos sugiere que estas moléculas no están implicadas en el reclutamiento de células inmunes al músculo. Por ejemplo, nunca se detectó la transcripción de CK1 ni de CK7A ni en los animales sin tratar, ni en ninguno de los grupos vacunados o controles a ninguno de los tiempos estudiados.

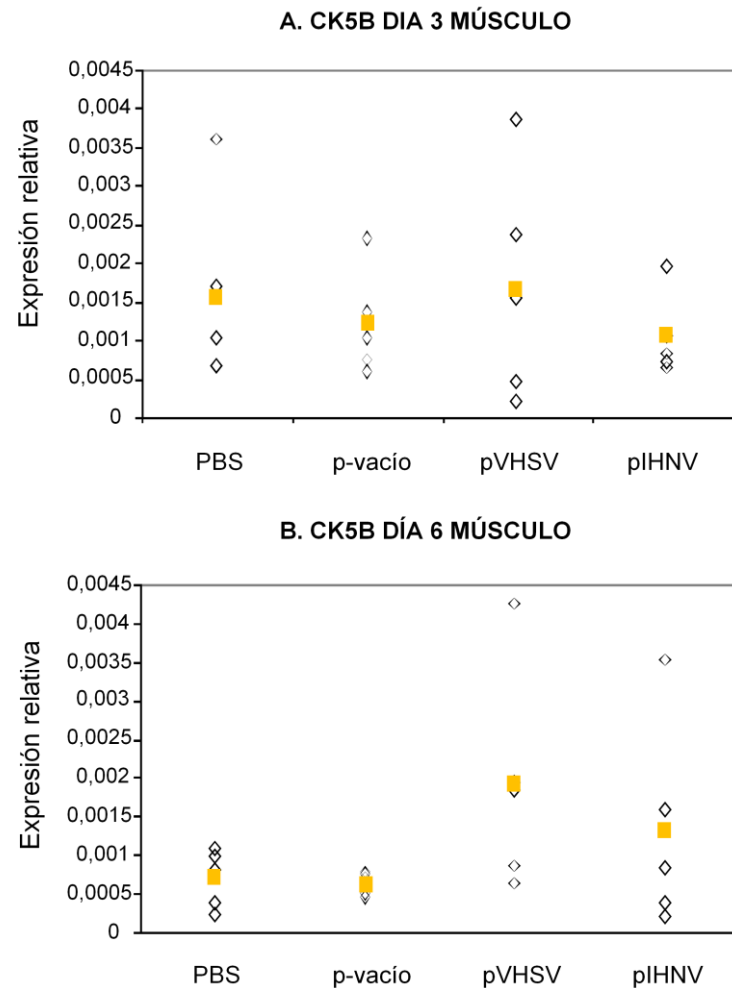
## RESULTADOS

Los valores de transcripción de CK3 a día 3 post-inyección fueron significativamente mayores en los grupos vacunados frente a VHSV e IHNV (especialmente en este último), en comparación con los niveles de transcripción detectados en el grupo al que se le administró el plásmido vacío (**Figura 20**). También a día 6 post-vacunación, la expresión de CK3 fue mayor en algunos individuos del grupo vacunado con el plásmido pIHNV. Sin embargo en ningún caso se alcanzaron diferencias significativas con el grupo inyectado con el plásmido vacío o con el inyectado con PBS únicamente.



**Figura 20. Niveles de transcripción de CK3 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.** Día 3 (A) y día 6 (B) post-inyección. Los peces se inyectaron con el plásmido vacío (p-vacio), la vacuna de VHSV (pVHSV) o la vacuna de IHNV (pIHNV) o con el mismo volumen de PBS. A distintos tiempos post-vacunación, se recogió el músculo alrededor de la zona del pinchazo y se evaluó la transcripción de CK3 por PCR a tiempo real. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$ . Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio se muestra como un cuadrado amarillo.

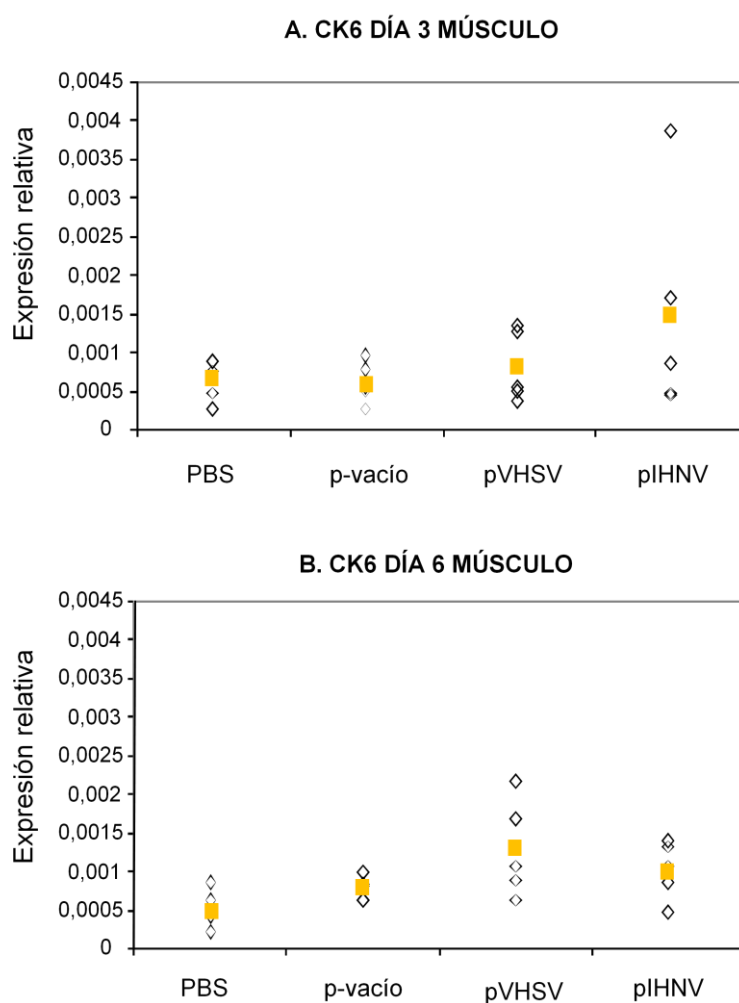
En el caso de la quimioquina CK5B, a pesar de que prácticamente no se detectaba transcripción constitutiva en los peces sin manipular, sí que se observó transcripción en los grupos inyectados. Sin embargo, a día 3 los valores de transcripción en los distintos grupos inyectados no mostraron diferencias significativas (**Figura 21**). A día 6 post-inyección la transcripción en los grupos control disminuyó respecto a los valores del día 3 mientras que los peces inyectados con los plásmidos vacunales mantuvieron unos valores transcripcionales de un rango similar, aunque sólo los niveles del grupo vacunado con pVHSV fueron significativamente mayores en comparación con los del grupo inyectado con el plásmido vacío, ya que la media de expresión del grupo vacunado con pIHNV se vio aumentada únicamente por una mayor expresión de sólo algunos individuos.



**Figura 21. Niveles de transcripción de CK5B en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.** Día 3 (A) y día 6 (B) post-inyección. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 20. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$ . Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado amarillo.

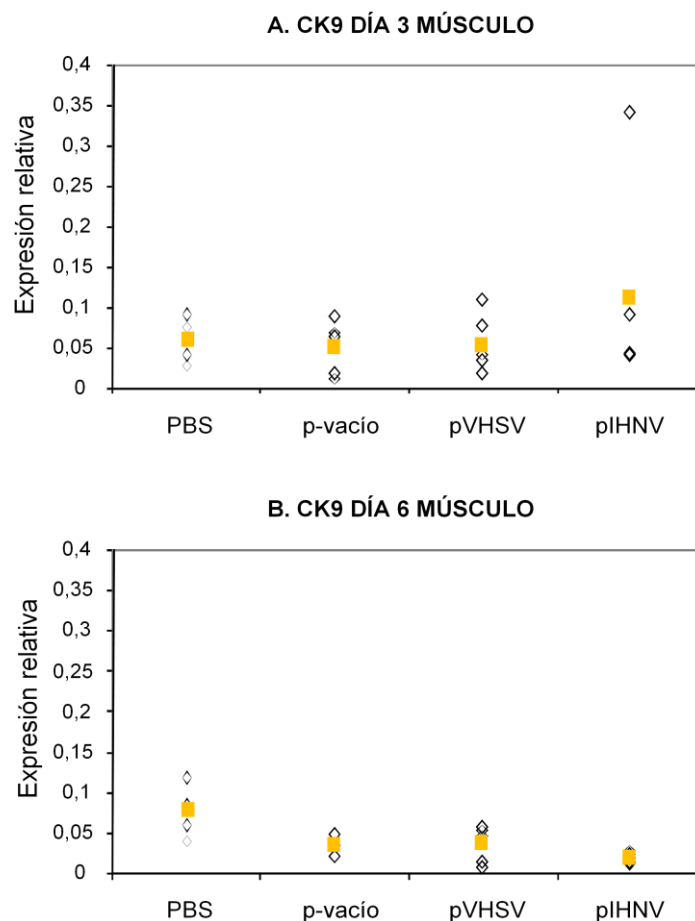
## RESULTADOS

A pesar de que los niveles de transcripción de la quimioquina CK6 en músculo permanecieron siempre muy bajos, en un rango parecido al observado en los peces no tratados, pudimos apreciar algunas diferencias importantes entre grupos (**Figura 22**). En ambos días post-vacunación, los valores de transcripción de los grupos inyectados con los plásmidos vacunales fueron algo más elevados que los de los grupos inyectados con PBS o con el plásmido vacío. A día 3 post-vacunación, algunos de los valores más altos se obtuvieron con la vacuna frente a IHNV. A día 6, por el contrario, los mayores niveles transcripcionales se obtuvieron en el grupo inyectado con la vacuna frente a VHSV, los cuales fueron significativamente más altos en comparación con los grupos control.



**Figura 22. Niveles de transcripción de CK6 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.** Día 3 (A) y día 6 (B) post-inyección. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 20. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$ . Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado amarillo

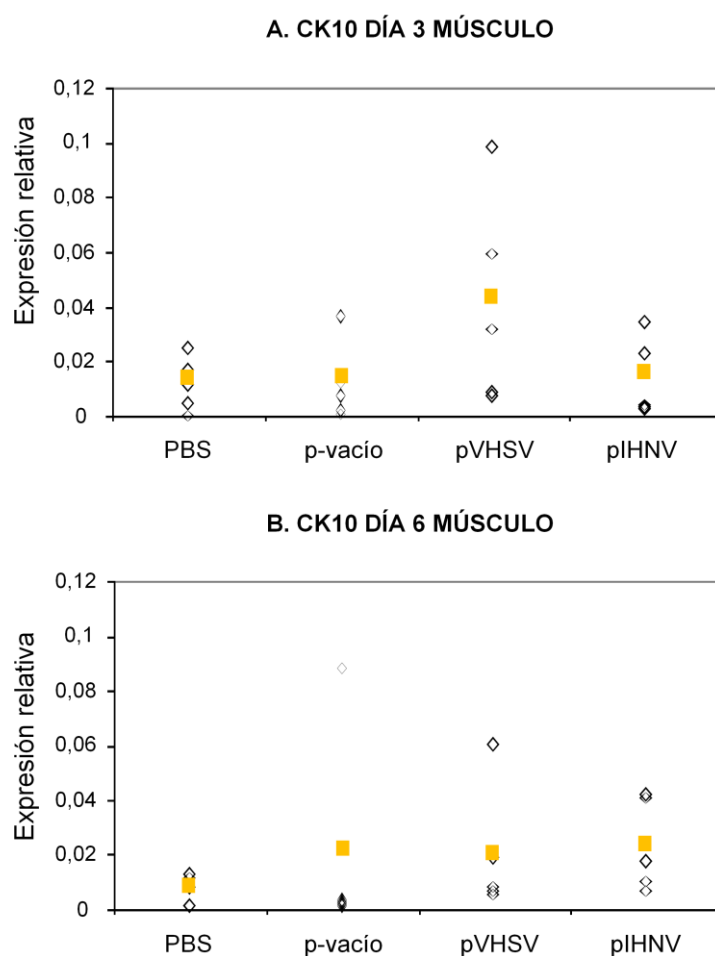
Respecto a los niveles de transcripción de CK9 en músculo, curiosamente los niveles de transcripción detectados en los animales sin manipular fueron mayores a los registrados en los grupos inyectados con cualquiera de los tratamientos. En estos grupos, la expresión de CK9 observada a día 3 post-inyección fue muy similar entre los diferentes grupos, con un aumento en algunos de los individuos del grupo vacunado con pIHNV (**Figura 23**). También a día 6 post-inyección los niveles permanecieron muy similares en todos los grupos. Sin embargo sí que se observó una disminución significativa de los niveles de transcripción del grupo inyectado con pIHNV en comparación con el grupo inyectado con el plásmido vacío. Estos resultados parecen sugerir que para esta quimioquina, la estimulación implica una reducción en los niveles de ARNm, lo que en algunos casos se podría correlacionar con una traducción más elevada de ARNm en casos en los que ésta se encuentre acumulada en las células.



**Figura 23. Niveles de transcripción de CK9 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.** Día 3 (A) y día 6 (B) post-inyección. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 20. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$ . Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado amarillo.

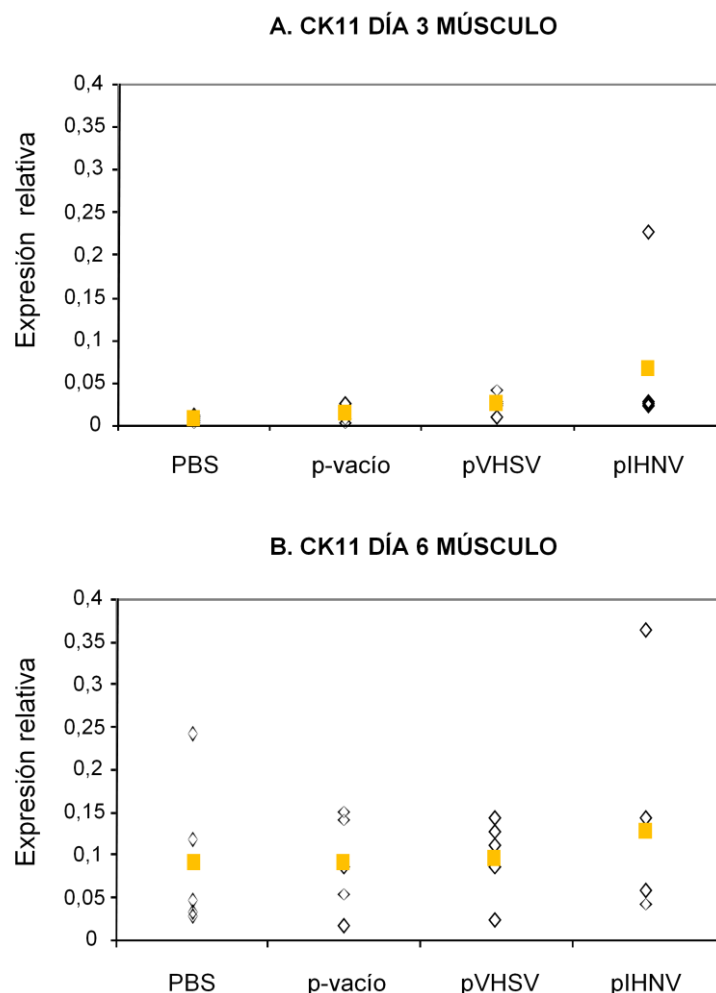
## RESULTADOS

El rango de los valores de transcripción de CK10 observados en los peces vacunados coincidía con el observado en los peces no tratados. Sin embargo, a día 3 post-inyección hubo un aumento significativo de la transcripción de esta quimioquina en el grupo vacunado frente a VHSV en comparación con el resto de grupos (**Figura 24**). No obstante, a día 6 post-inyección la expresión disminuyó en este grupo, mientras que aumentaron los niveles de expresión de varios individuos del grupo inyectado con el plásmido pIHNV, aunque sin llegar a alcanzar diferencias significativas.



**Figura 24. Niveles de transcripción de CK10 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.** Día 3 (A) y día 6 (B) post-inyección. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 20. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$ . Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado amarillo.

Al analizar el comportamiento de la quimioquina CK11 se observó que, sorprendentemente, los valores de expresión basales casi duplicaban los mayores valores obtenidos en individuos de los grupos inyectados con algunos de los tratamientos. Un vez analizado el comportamiento de los grupos tratados con las construcciones vacunales o los controles se observó que a día 3 post-inyección los niveles de expresión aumentaban ligeramente en los grupos inyectados con los plásmidos vacunales, aunque sólo el grupo vacunado con pVHSV mostró un aumento significativo de la transcripción. A pesar de ello, los mayores valores se alcanzaron en algunos individuos del grupo vacunado con pIHNV (**Figura 25**). A día 6 post-inyección, los niveles de expresión de esta quimioquina aumentaron en todos los grupos, aunque no se observaron diferencias significativas entre ellos.

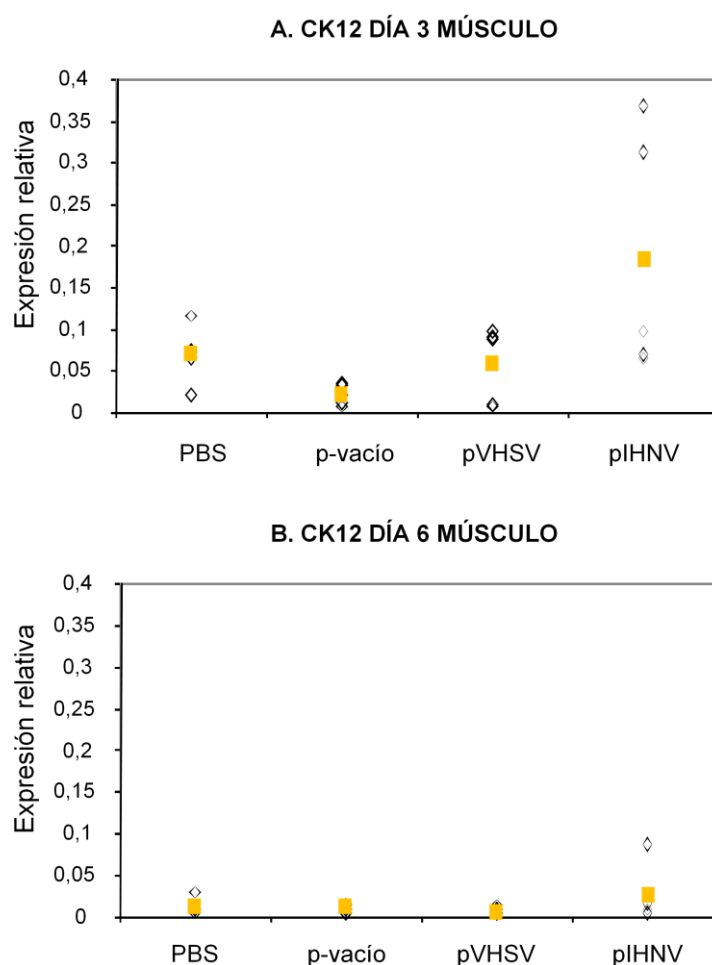


**Figura 25. Niveles de transcripción de CK11 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.** Día 3 (A) y día 6 (B) post-inyección. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 20. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$ . Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado amarillo.



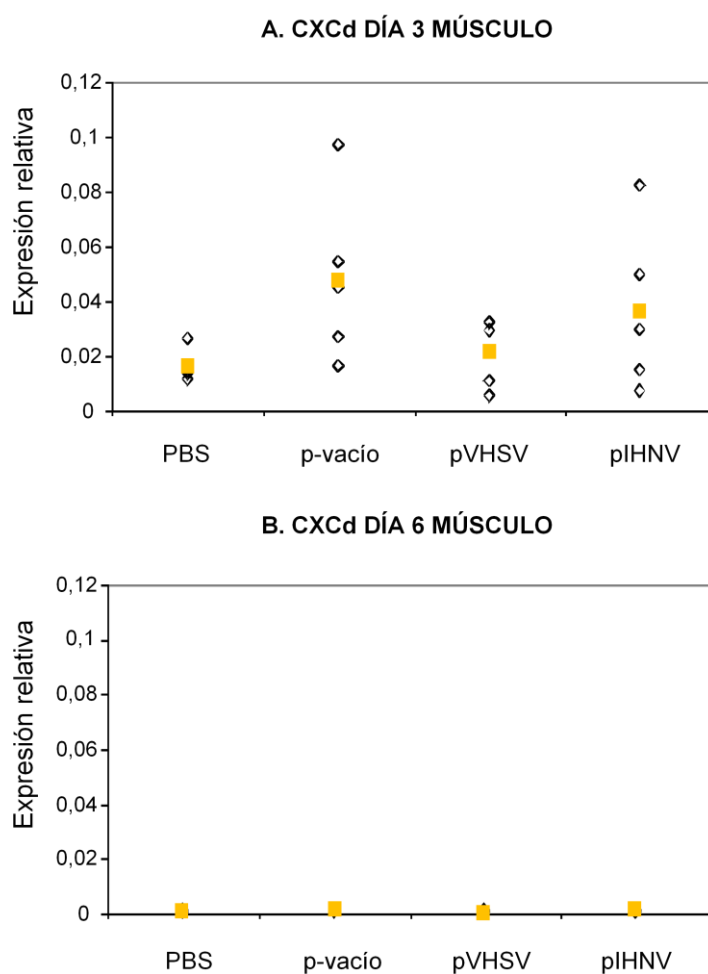
## RESULTADOS

En el caso de la CK12, los niveles de transcripción basales fueron menores que los observados en los grupos vacunados y los controles a día 3 post-inyección. Además, a día 3 post-vacunación, la quimioquina CK12 mostró unos niveles de transcripción en el músculo en respuesta a pIHNV y a pVHSV significativamente más altos que los observados en el grupo inyectado con el plásmido vacío (**Figura 26**). Sin embargo, a día 6 post-inyección, los niveles de transcripción disminuyeron en todos los grupos, incluyendo los vacunados.



**Figura 26. Niveles de transcripción de CK12 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.** Día 3 (A) y día 6 (B) post-inyección. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 20. Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado amarillo.

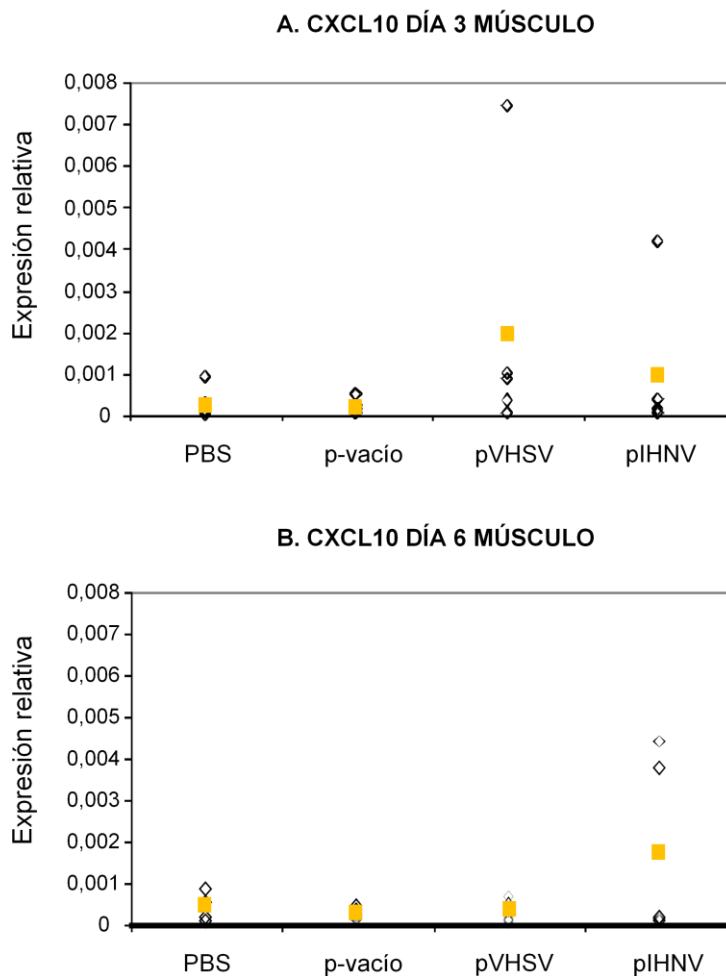
Los niveles de expresión basales de CXCL1 fueron bajos pero detectables. A día 3 post-inyección se pudieron detectar niveles de transcripción de la quimioquina CXCL1 en el músculo significativamente más elevados que a día 6 post-inyección, en el cual los niveles de ARNm de CXCL1 disminuyeron en todos los grupos hasta niveles casi indetectables, al igual que los niveles basales. La única diferencia significativa que se observó fue una disminución de la transcripción de esta quimioquina en el grupo inyectado con pVHSV en relación al plásmido vacío a día 3 post-administración (**Figura 27**).



**Figura 27. Niveles de transcripción de CXCL1 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.** Día 3 (A) y día 6 (B) post-inyección. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 20. Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado amarillo.

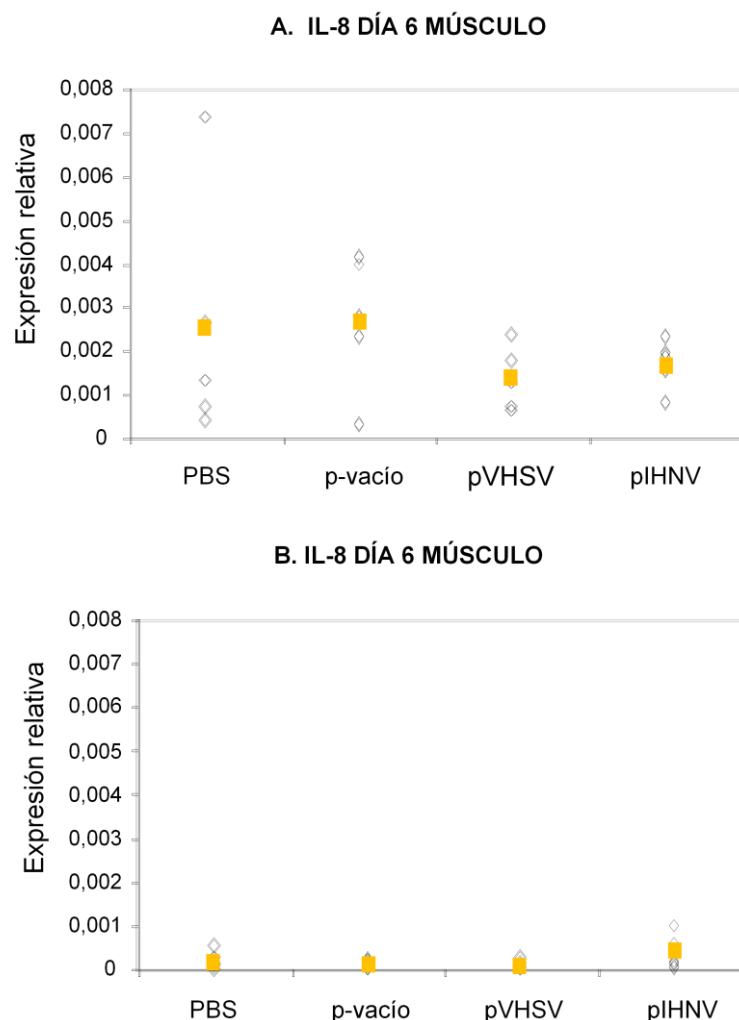
## RESULTADOS

Respecto a la expresión de CXCL10, sus niveles basales fueron indetectables. En respuesta al tratamiento, a día 3 post-inyección, los grupos inyectados con las construcciones vacunales mostraron unos niveles de transcripción más elevados en algunos de los individuos, pero en conjunto no mostraron diferencias significativas respecto al valor del grupo tratado con el plásmido vacío (**Figura 28**). No obstante, a día 6 post-inyección, los niveles de transcripción del grupo vacunado con pIHNV aumentaron de forma significativa en relación al resto de grupos.



**Figura 28. Niveles de transcripción de CXCL10 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.** Día 3 (A) y día 6 (B) post-inyección. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 20. Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado amarillo.

Por último se analizaron los niveles de transcripción de la IL-8 en el músculo (**Figura 29**). Los niveles basales fueron indetectables y sin embargo sí se detectó su expresión en los grupos inyectados con los diferentes tratamientos. Los niveles de expresión de IL-8 fueron más elevados a día 3 post-inyección, sin diferencias significativas entre el grupo vacunado con pIHNV, el inyectado con el plásmido vacío y el PBS. A pesar de esto, sí se observó una disminución significativa de la transcripción del grupo vacunado con pVHSV en relación al grupo tratado con el plásmido vacío. A día 6 post-vacunación, los niveles de expresión disminuyeron hasta niveles apenas detectables en todos los grupos. Sin embargo, a pesar de esto, la transcripción fue significativamente más elevada en el grupo vacunado con pIHNV que la del grupo de los individuos inyectados con el plásmido vacío.



**Figura 29. Niveles de transcripción de IL-8 en músculo en respuesta a la vacunación ADN intramuscular.** Día 3 (A) y día 6 (B) post-inyección. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 20. Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado amarillo.

## RESULTADOS

El resumen de la información de los resultados obtenidos en este experimento se muestra en la **Tabla 3**, en la que se indican cuales fueron las diferencias significativas entre los grupos vacunados y el plásmido vacío, indentificando así las quimioquinas con una mayor relevancia.

Quimioquinas	Plásmidos vacunales y días post-vacunación			
	pVHSV día 3	pIHNV día 3	pVHSV día 6	pIHNV día 6
CK1	ND	ND	ND	ND
CK3	=	=	=	=
CK5B	=	=	↑	=
CK6	=	=	↑	=
CK7	ND	ND	ND	ND
CK9	=	=	=	↓
CK10	↑	=	=	=
CK11	↑	=	=	=
CK12	↑	↑	=	=
CxCd	=	↓	=	=
CxCL10	=	=	=	↑
IL-8	↓	=	=	↑

Tabla 3. Resumen de las diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes de quimioquinas observados en músculo en respuesta a los plásmidos vacunales respecto a los observados con el plásmido vacío. ↑ Aumento significativo; ↓ Disminución significativa; = No se observan diferencias significativas; ND No detectado.

### 3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE LOCAL TRAS LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE VACUNAS ADN

#### 3.1. Encapsulación de la vacuna ADN en alginatos

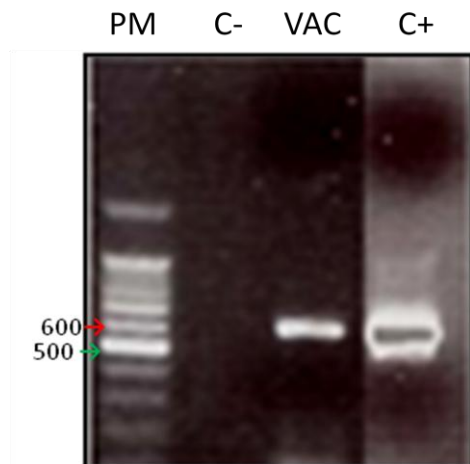
Con el fin de valorar la posibilidad de utilizar la vía oral como método de administración alternativo a la inyección intramuscular de las vacunas ADN frente a rabdovirus, se encapsularon los plásmidos vacunales en microcápsulas de alginato siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos, protocolo que previamente había demostrado ser eficaz para una vacuna ADN frente a IPNV (de las Heras *et al.*, 2010). Gracias a la encapsulación, la vacuna está protegida frente a la degradación en el entorno gastrointestinal, atraviesa las paredes del aparato digestivo y entra en la circulación general y/o los tejidos.

Una vez encapsuladas las vacunas pVHSV, pIHNV y el plásmido vacío, se comprobó que las vacunas se encontraban dentro de las microsferas por medio de una PCR tradicional con primers específicos, estimándose la concentración de vacuna en las microesferas por espectrofotometría. Los productos de PCR esperados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (**Figura 30**).

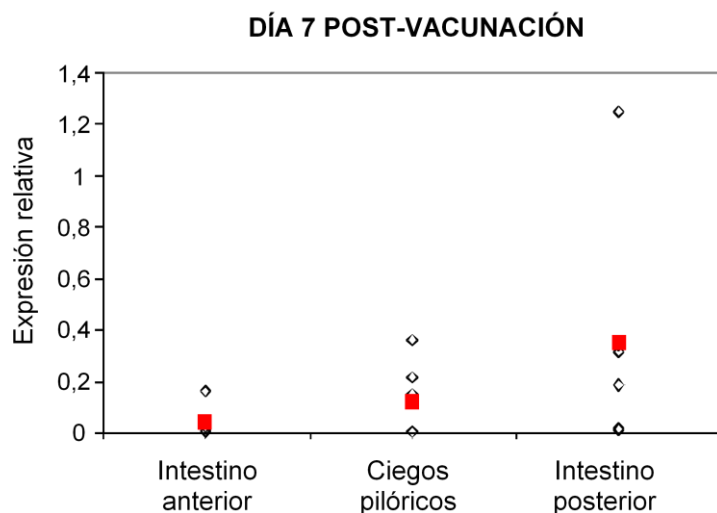
#### 3.2. Expresión de la vacuna en el intestino

El protocolo de administración de la vacuna oral a trucha arcoíris se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Lo primero que hicimos una vez realizada la administración oral de la vacuna pVHSV fue analizar la magnitud de la absorción de la vacuna en los distintos fragmentos de intestino recogidos en los peces a día 7 post vacunación. La absorción de la vacuna fue analizada por PCR cuantitativa detectando el gen de la proteína G de la vacuna pVHSV. Como se puede observar en la **Figura 31**, la vacuna se expresó en mayor cantidad a lo largo del tracto digestivo, es decir, en el intestino anterior ya se puede ver la expresión de la vacuna pero en una cantidad menor que en los ciegos pilóricos, siendo la expresión aún mayor en el intestino posterior. Esto quiere decir que la absorción de la vacuna va aumentando a medida que ésta es digerida en el tracto digestivo. La digestión de los alginatos provocaría la liberación de la vacuna para dar lugar a una expresión cada vez mayor de la proteína G a lo largo de las distintas partes del tracto digestivo de los peces.

## RESULTADOS



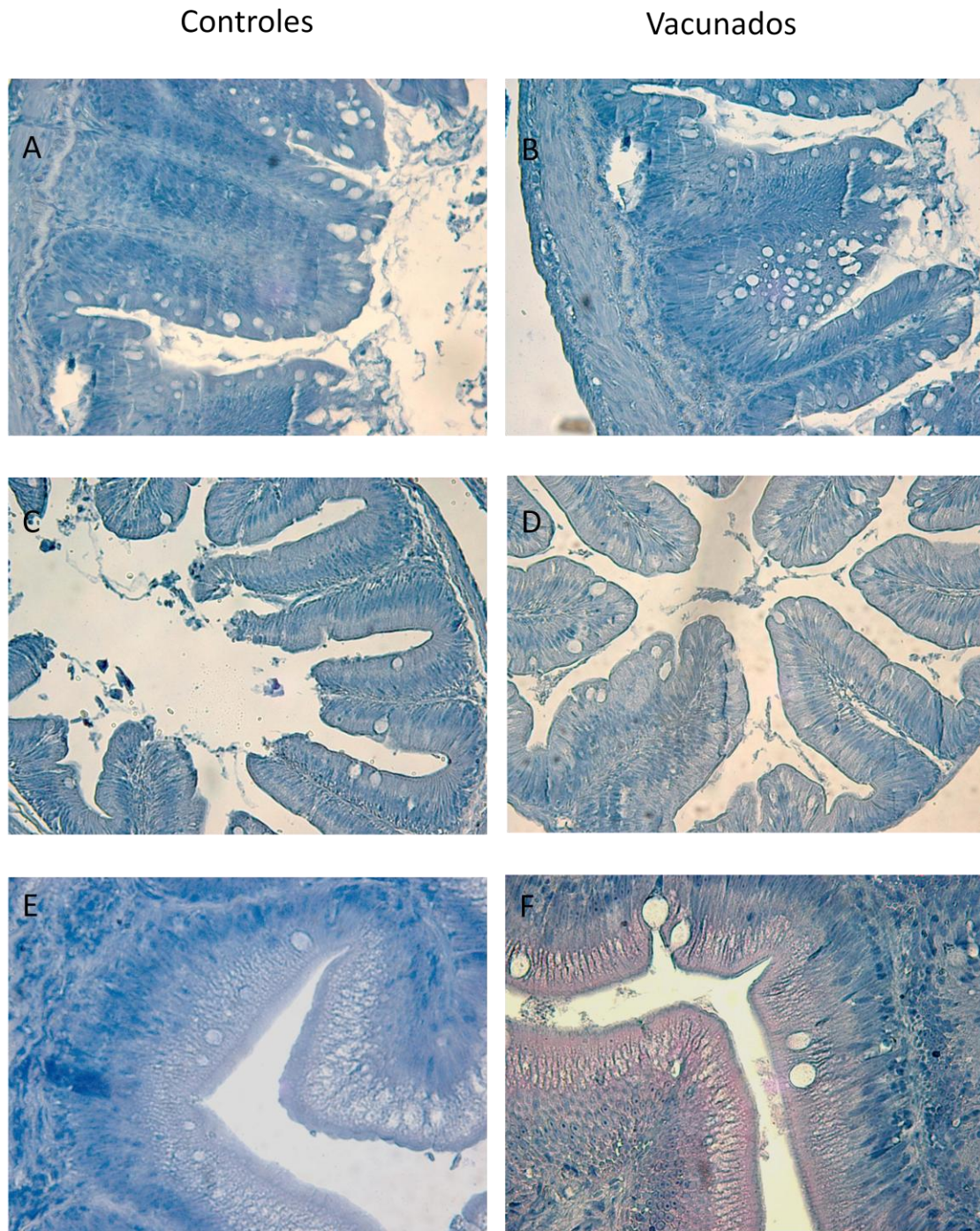
**Figura 30. Evidencia de la vacuna pVHSV dentro de las cápsulas de alginatos por PCR y visualización en gel teñido con bromuro de etidio.** PM es el marcador de peso molecular de ADN, C+ es el control positivo de la reacción y corresponde al plásmido vacunal pVHSV que codifica la proteína G de VHSV sin incluir en las esferas de alginato, C- corresponde al control negativo de la reacción (plásmido vacío) y VAC corresponde a la muestra de ADN liberada de las cápsulas de alginato cuyo producto (625 pares de bases) corresponde al fragmento amplificado del gen de la proteína G de VHSV. El mismo procedimiento se llevó a cabo para evidenciar la vacuna pIHNV dentro de las cápsulas de alginato.



**Figura 31. Expresión de la vacuna en los diferentes fragmentos del tracto intestinal de los peces vacunados oralmente.** Peces vacunados con con 10  $\mu$ g de la vacuna pVHSV a día 7 post-vacunación. Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado rojo.

Corroborando estos resultados, hemos visto por medio de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal específico para la G de VHSV, que sólo en la parte más posterior del intestino se detecta de forma significativa la vacuna (**Figura 32**). Dado que la PCR es una técnica más sensible que la inmunohistoquímica, no hemos sido capaces de detectar la glicoproteína viral en los otros segmentos, aunque dado que detectamos transcritos por PCR es posible que si se esté dando también una traducción residual. Respecto al tiempo post-vacunación, se pudo detectar de forma más clara la G de VHSV a día 21 post-vacunación.





**Figura 32. Inmunohistoquímica de los distintos segmentos del intestino de animales vacunados oralmente con pVHSV para la detección de la proteína G de VHSV.** Las fotografías A, C y E corresponden a peces control tratados con el plásmido vacío, mientras que las fotografías B, D y F corresponden a animales vacunados a día 21 post-vacunación. Por otra parte, las fotografías A y B muestran la zona del intestino anterior, las C y D la zona de los ciegos pilóricos y las E y F la zona del intestino posterior. La positividad frente a la G de VHSV se visualiza en rojo/rosa. Fotografía tomada a 20x.



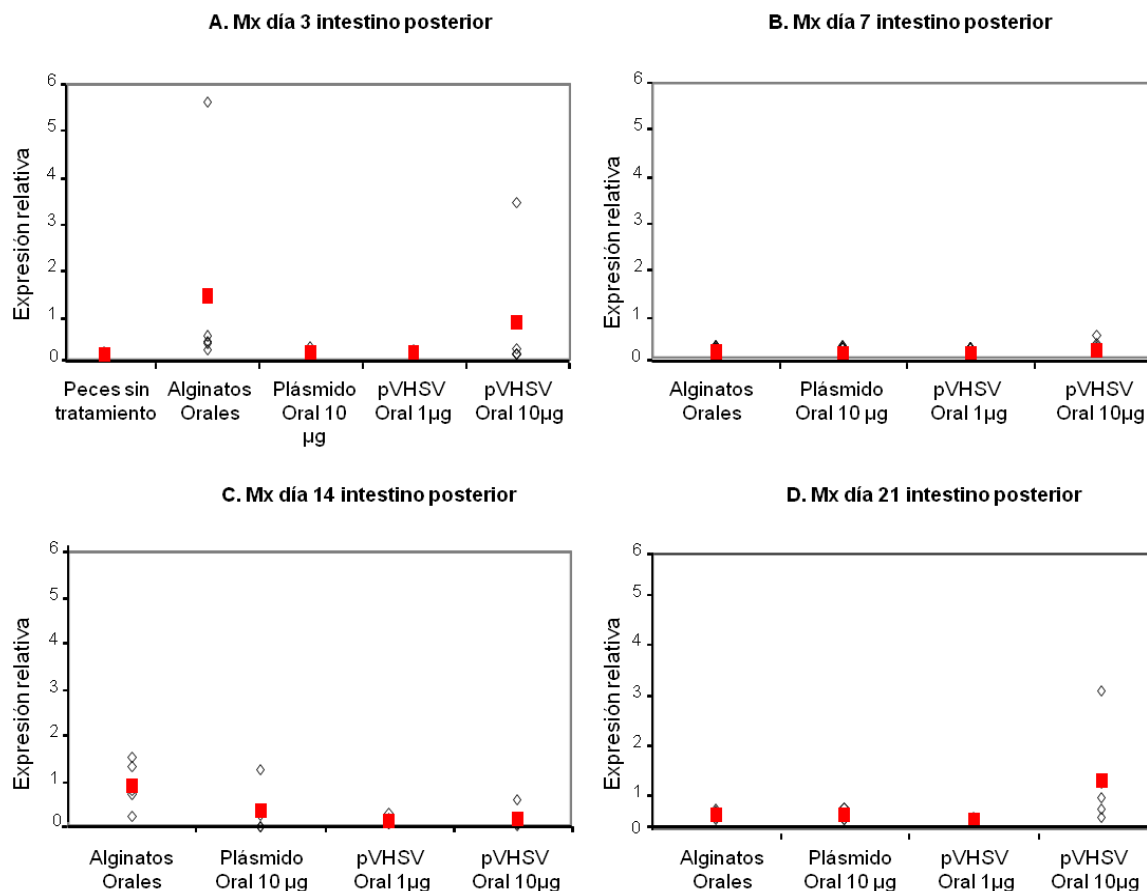
## RESULTADOS

### 3.3. Niveles de transcripción de genes inmunes en la mucosa intestinal

Una vez comprobado que tras la administración oral de las vacunas ADN encapsuladas en alginato, el antígeno vacunal se expresa en el tracto digestivo, quisimos estudiar la respuesta inmune desatada en el intestino posterior con el fin de comprender qué tipo de respuesta se desata en esta zona del intestino donde la expresión del antígeno es mayor y donde una mayor cantidad de células inmunes está presente (Bernard *et al.*, 2006). Para ello, se analizaron los niveles de transcripción de distintos genes inmunes representativos de una respuesta inmune a nivel de mucosas tales como Mx, IgT (inmunoglobulina característica de mucosas) (Zhang *et al.*, 2010), IgM, CK12 (quimioquina responsable del reclutamiento de linfocitos inactivados a mucosas) (Montero *et al.*, 2011) o el receptor de quimioquinas de mucosas CCR7 identificado en nuestro grupo (datos no publicados).

#### Transcripción Mx en el intestino posterior

En el caso de la transcripción de Mx, no encontramos una correlación clara entre expresión de la vacuna y niveles de Mx a tiempos cortos post-vacunación (**Figura 33**). Sólo a día 21 post-vacunación los niveles de transcripción de Mx en el grupo vacunado con la dosis de 10 µg mostraba unos niveles de Mx significativamente mayores que el resto de los grupos controles.



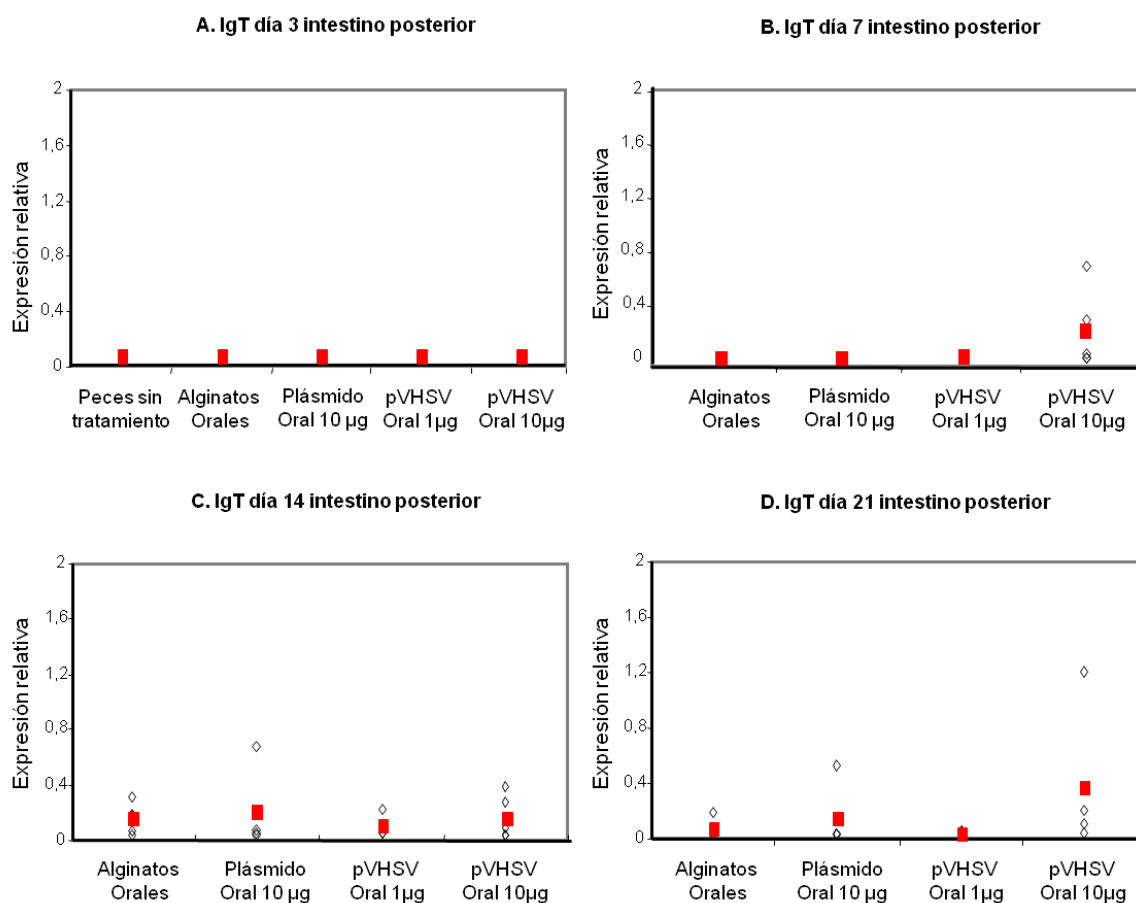
**Figura 33. Transcripción de Mx en el intestino posterior tras la vacunación oral.** Días 3 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) post-administración en los grupos tratados con los alginatos orales, 10 µg del plásmido vacío encapsulado, 1 µg de la vacuna oral (pVHSV) y 10 µg de la vacuna oral. Además también se evaluó la transcripción de Mx en el intestino de los peces sin tratamiento (sólo día 3 post-administración). Se evaluó la transcripción de Mx por PCR a tiempo real. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1α. Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado rojo.

Estos resultados, que se repiten para la mayoría de genes inmunes estudiados, parecen indicar que los efectos inmunes derivados de la administración por vía oral de la vacuna ADN para VHSV se producen de una forma mucho más tardía que los efectos observados tras la administración intramuscular, probablemente debido a la presencia de los alginatos, y/o a un control más estricto de la respuesta inmune en la mucosa intestinal.

## RESULTADOS

### Transcripción IgT en el intestino posterior

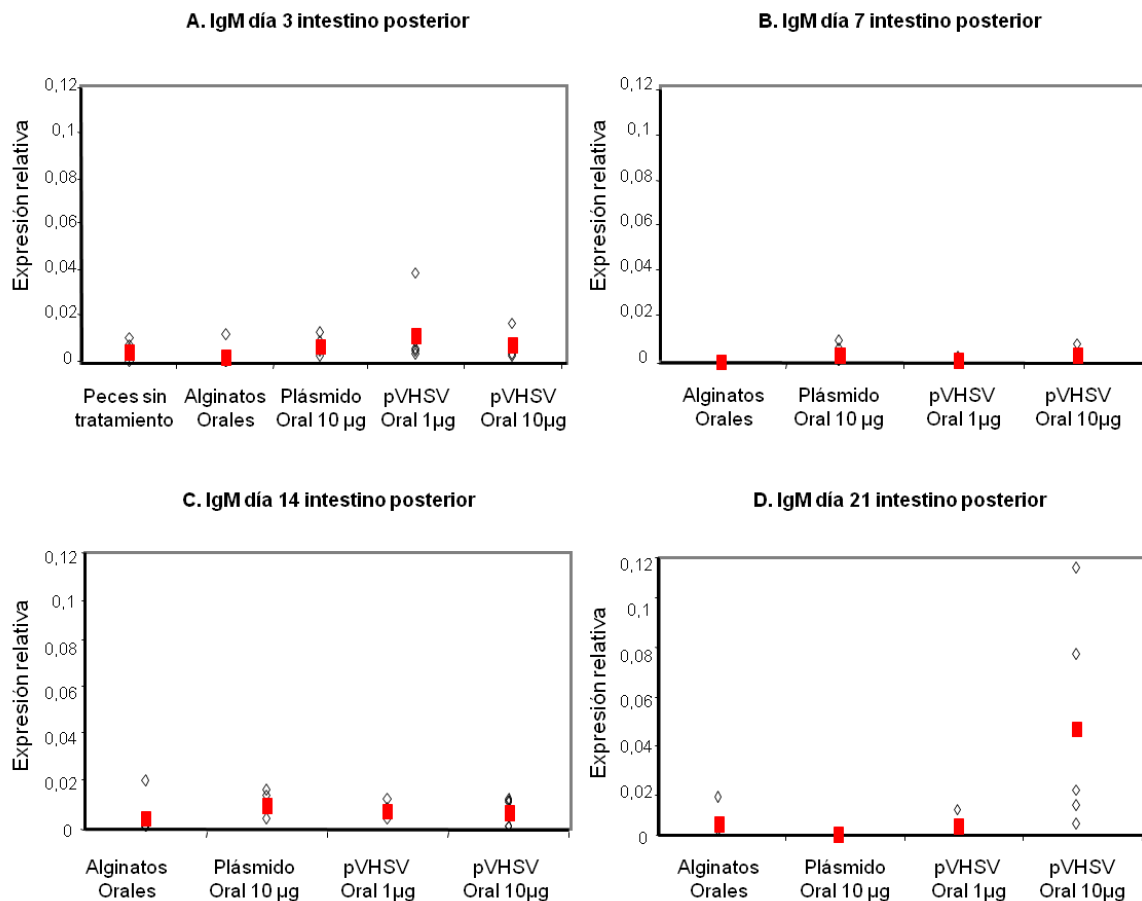
La transcripción de IgT sólo se comenzó a detectar a partir del día 7 post-vacunación y solamente en el grupo vacunado con 10  $\mu$ g de la vacuna pVHSV (**Figura 34**). A día 14 post-vacunación, los niveles de transcripción de IgT aumentaron en todos los grupos siendo mayoritarios los del grupo vacunado con el plásmido vacío y el grupo vacunado con la dosis más alta de la vacuna pVHSV. Finalmente, los mayores niveles de expresión de IgT fueron alcanzados a día 21, nuevamente en el grupo vacunado con 10  $\mu$ g de la vacuna pVHSV, lo que sugiere la implicación de IgT en la modulación inmune en el intestino posterior frente a la vacuna oral.



**Figura 34. Transcripción de IgT en el intestino posterior tras la vacunación oral.** Días 3 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) post-administración. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 33. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$ . Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado rojo.

### Transcripción de IgM en el intestino posterior

Aunque ya a día 3 post-vacunación se detectó la transcripción de IgM en todos los grupos, los mayores niveles se alcanzaron en el grupo de peces vacunados con 1  $\mu\text{g}$  de la vacuna pVHSV, siendo los niveles algo menores en los peces expuestos al plásmido vacío y los vacunados con la vacuna pVHSV con una dosis mayor (**Figura 35**). A días 7 y 14 post-vacunación, los niveles de transcripción de IgM fueron muy similares en todos los grupos. Finalmente a día 21 post-administración, los niveles de transcripción de IgM fueron significativamente más altos en los peces vacunados oralmente con la dosis más alta de la vacuna pVHSV.

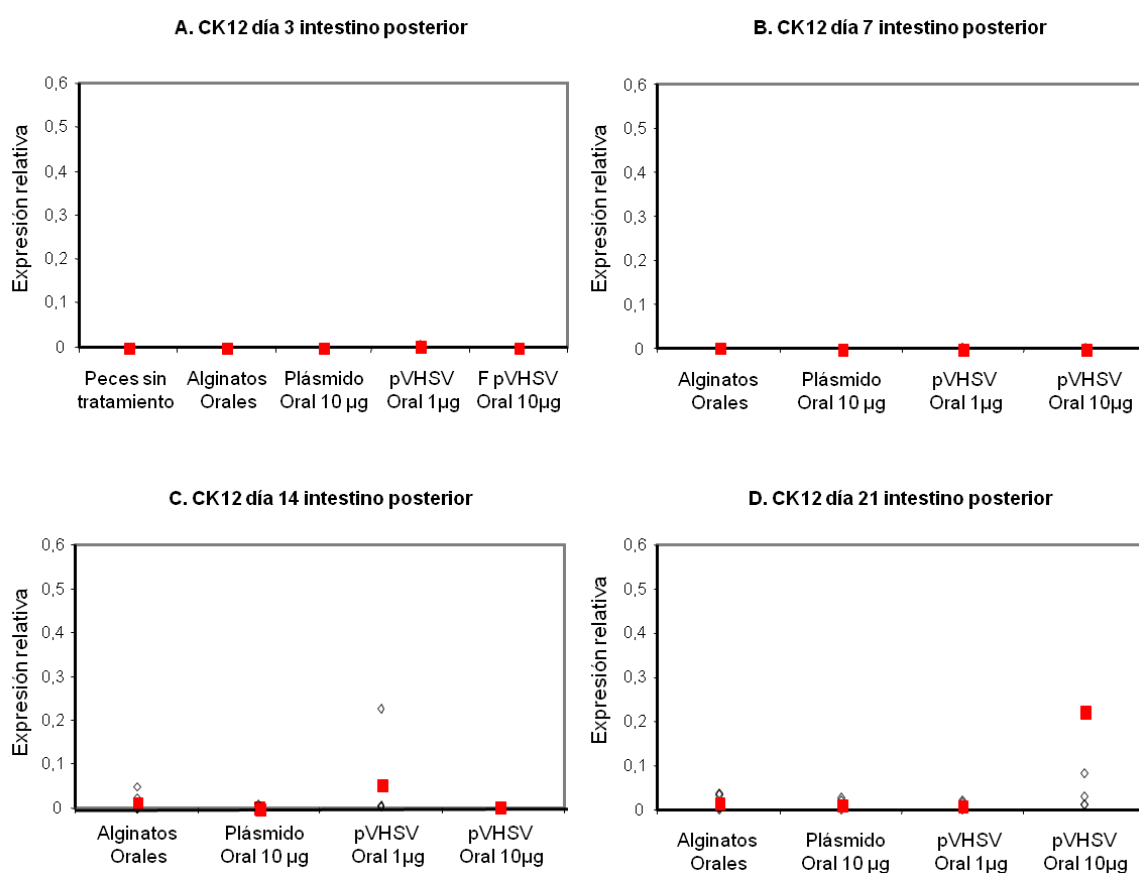


**Figura 35. Transcripción de IgM en el intestino posterior tras la vacunación oral.** Días 3 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) post-administración. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 33. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$ . Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado rojo.

## RESULTADOS

### Transcripción de CK12 en el intestino posterior

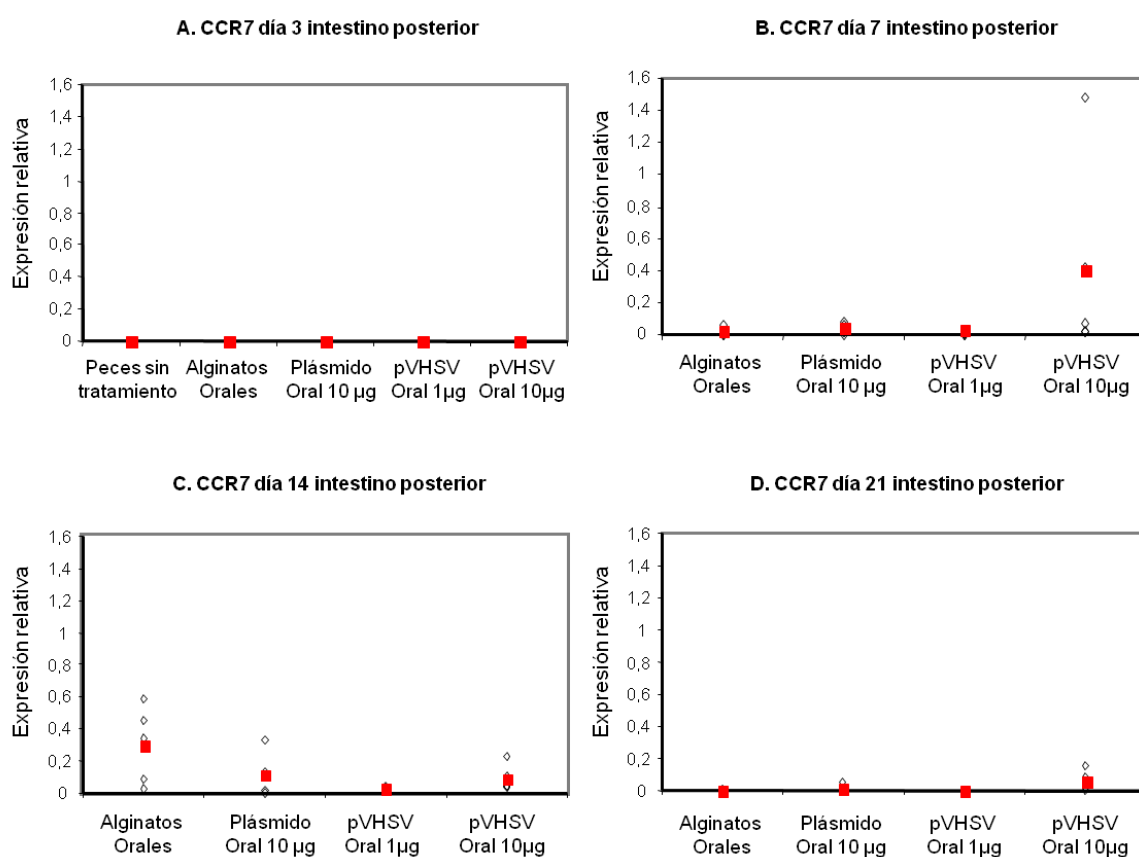
La transcripción de CK12 no se detectó hasta el día 14 post-vacunación y en este punto, sólo en el grupo de peces vacunados con 1  $\mu$ g de la vacuna pVHSV mostró una inducción significativa de la transcripción de esta quimioquina (**Figura 36**). Sin embargo, a día 21 post-vacunación, los niveles de transcripción en este grupo volvieron a los niveles basales, mientras que en este momento se observó un aumento significativo de los valores de transcripción de CK12 en el grupo vacunado con 10  $\mu$ g de pVHSV.



**Figura 36. Transcripción de CK12 en el intestino posterior tras la vacunación oral.** Días 3 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) post-administración. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 33. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$ . Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado rojo.

### Transcripción de CCR7 en el intestino posterior

La transcripción de CCR7 aumentó significativamente a día 7 post-vacunación en el grupo vacunado con 10  $\mu$ g de pVHSV respecto a lo observado en los otros grupos (**Figura 37**). A día 14 post-vacunación, la expresión de CCR7 disminuyó en este grupo y sin embargo aumentó en el grupo de peces que habían sido tratados con los alginatos orales, seguido del grupo del plásmido vacío. A día 21, de nuevo los valores de expresión más altos se encontraron entre los individuos vacunados con la dosis más alta de la vacuna oral pVHSV.



**Figura 37. Transcripción de CCR7 en el intestino posterior tras la vacunación oral.** Días 3 (A), 7 (B), 14 (C) y 21 (D) post-administración. Los animales se trataron y muestrearon tal como se indica en la leyenda de la Figura 33. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$ . Los datos individuales se muestran como rombos vacíos mientras que el valor medio, se muestra como un cuadrado rojo.

## RESULTADOS

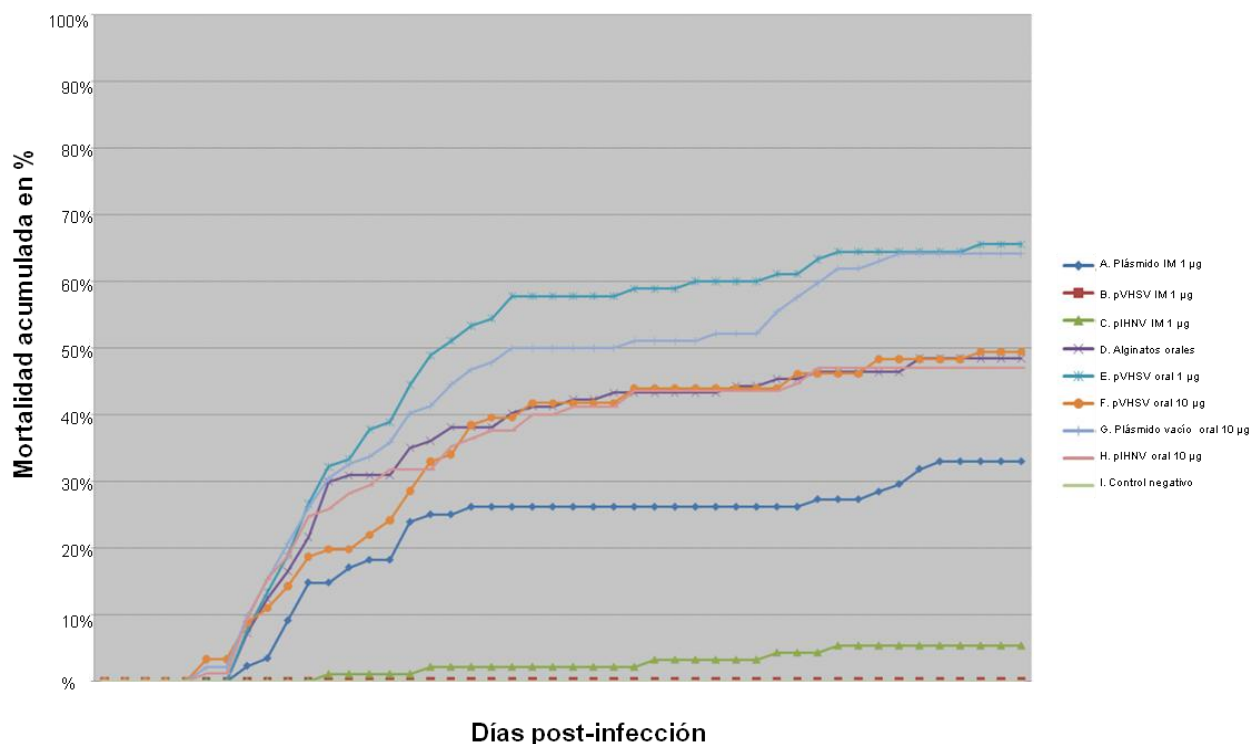
### 3.4. Producción de anticuerpos neutralizantes

Una vez analizada la respuesta inmune local quisimos ver si la administración oral de la vacuna ADN provocaba efectos sistémicos. Respecto al análisis de anticuerpos neutralizantes en el suero de los peces a los que se les administraron los diferentes plásmidos por vía oral, no se encontraron diferencias en el número de IgMs específicas neutralizantes entre los grupos vacunados y los controles. Esto demuestra que, a pesar de que se indujo una respuesta local, no se indujo mediante este tipo de vacunación una respuesta humoral sistémica.

### 3.5. Protección frente al desafío

Para determinar si la administración oral de la vacuna ADN frente a VHSV cubierta en alginato era capaz de conferir protección frente a un posterior desafío con VHSV, los peces vacunados fueron infectados con una dosis letal de VHSV por baño a día 42 post-vacunación. A partir de ese momento, analizamos el porcentaje de mortalidad acumulada a lo largo de 46 días de todos los grupos tratados con las diferentes construcciones vacunales más el grupo control de peces que no habían recibido ningún tratamiento. Los peces de cada grupo fueron divididos en tres tanques de 30 peces cada uno y se analizó la mortalidad en cada tanque.

La administración de la vacuna ADN frente a VHSV por vía intramuscular, fue capaz de conferir una protección del 100% frente al virus, sin que se registrara ninguna mortalidad. Sorprendentemente, los peces tratados con la vacuna pIHNV por vía intramuscular y posteriormente infectados con VHSV no mostraron una mortalidad elevada (aproximadamente del 5%), lo que nos indica que aún habiéndose realizado la infección a tiempos muy tardíos post-vacunación, se obtuvo cierta protección cruzada. Una mayor mortalidad (cercana al 32%) se obtuvo en los peces inyectados intramuscularmente con el plásmido vacío (**Figura 38**).



**Figura 38.** Mortalidad representada en porcentaje de todos los grupos vacunados y el control negativo en el desafío frente a VHSV representada a lo largo de 46 días.

Los grupos vacunados de forma oral sufrieron en todos los casos mortalidades mayores que los vacunados por vía intramuscular. De hecho, los grupos que sufrieron unas mayores mortalidades (cercasas al 65%) fueron tanto el grupo vacunado de forma oral con el plásmido vacío a una dosis de 10 µg como el grupo vacunado oral con 1 µg de plásmido pVHSV. Mortalidades algo menores (en torno al 50%) registraron los grupos vacunados con 10 µg de los plásmidos pVHSV o pIHNV, así como el grupo tratado con alginatos (sin plásmido). Los peces que no habían recibido ningún tratamiento no se infectaron con VHSV y no se registraron mortalidades en ninguno de los tanques (**Figura 38**).

Por lo tanto, y a pesar de que la administración oral de la vacuna ADN frente a VHSV provoca una respuesta inmune a nivel local, mediante la expresión del antígeno viral en el intestino, esta respuesta no es suficiente para combatir una posterior infección viral.

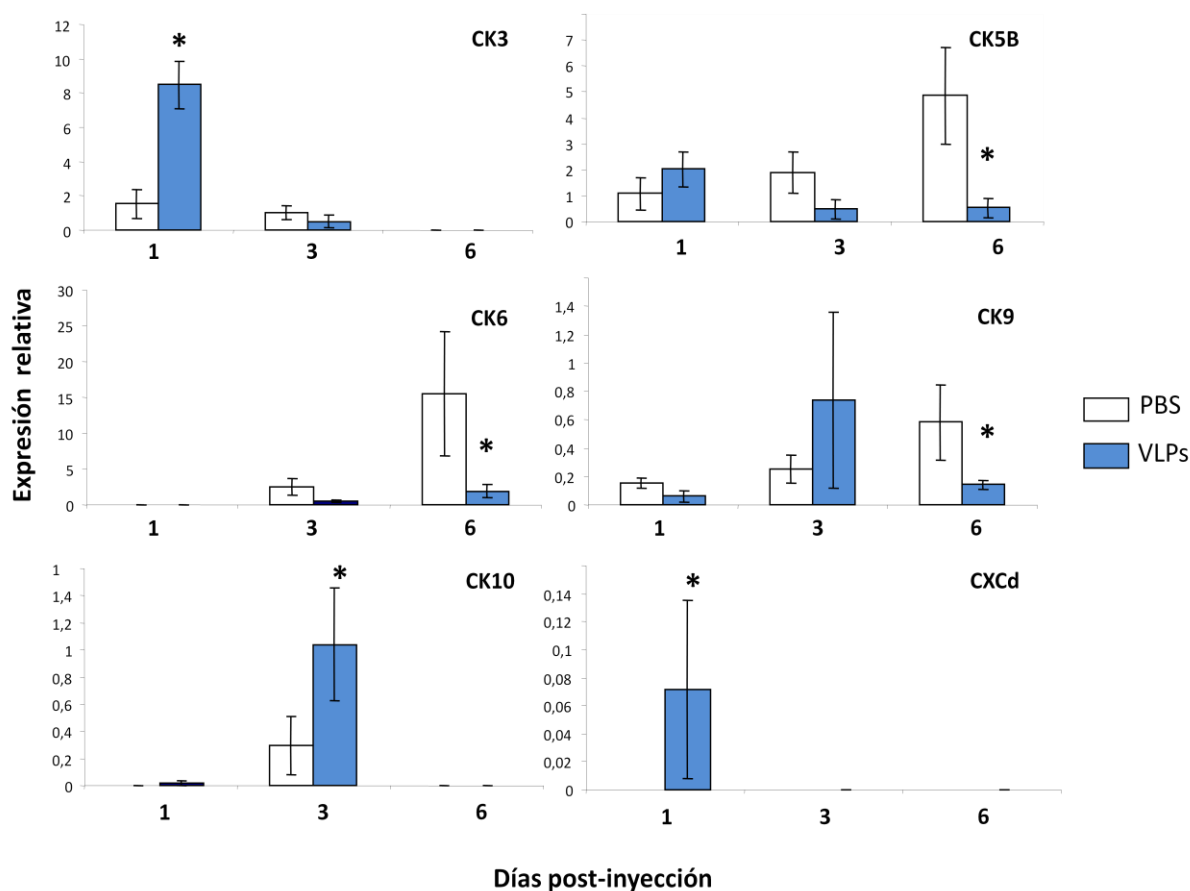


### 4. Respuesta inmune desatada por la administración intraperitoneal de VLPs de IPNV

#### 4.1. Efectos sobre la transcripción de quimioquinas en bazo

En este tema, quisimos estudiar qué ocurría a nivel de transcripción de genes inmunes cuando las truchas se inoculaban con otro tipo de vacunas no ADN, en este caso cápsidas virales vacías o VLPs. Este tipo de estructuras son altamente inmunogénicas para virus no envueltos tales como IPNV. Además, estudios previos realizados en nuestro grupo habían determinado los efectos en la transcripción de genes inmunes de una vacuna ADN frente a IPNV que codificaba para estas mismas proteínas virales presentes en las VLPs (Cuesta *et al.*, 2010), de tal forma que con este estudio podíamos comparar la respuesta inmune desatada por ambos tipos de vacunas.

En primer lugar estudiamos los niveles de expresión de genes de varias quimioquinas en respuesta a la administración intraperitoneal de VLPs en el bazo. Estudiamos doce genes de quimioquinas, que incluían todas las quimioquinas CXC descritas en trucha arcoíris y una quimioquina representativa de cada uno de los grupos filogenéticos establecidos para las quimioquinas CC por Peatman y Liu (Peatman y Liu, 2007). De los doce genes estudiados, CK1, CK7A, CK11, CK12,  $\gamma$ IP e IL-8 no fueron detectados en ninguna de las muestras de bazo a niveles significativos. Por otro lado, CK3, CK5B, CK6, CK9, CK10 y CXCD parecían estar implicadas en la respuesta inmune en el bazo frente a las VLPs (**Figura 39**). Los niveles de transcripción de CK3 y CXCD se incrementaron significativamente en el día 1 post-inyección, mientras que los niveles de transcripción de CK10 se incrementaron a día 3 post-inyección. En comparación con los niveles observados en los animales control, los niveles de transcripción de CK5B, CK6, y CK9 disminuyeron significativamente en respuesta a las VLPs a día 6 post-inyección.

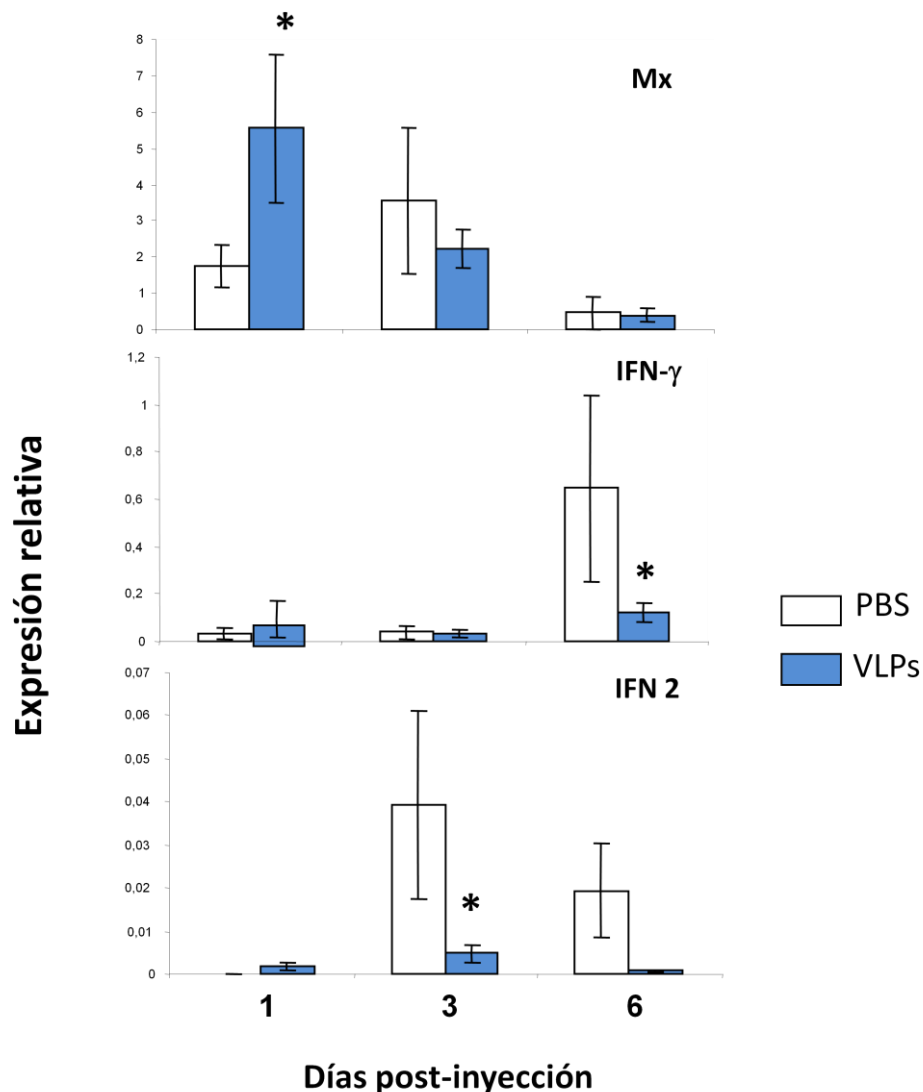


**Figura 39. Expresión de genes de quimioquinas en el bazo en respuesta a la administración de VLPs.** Las VLPs fueron administradas intraperitonealmente y la expresión de genes de quimioquinas en el bazo fue determinada a través de PCR a tiempo real a diferentes tiempos post-inyección. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar. (N=5). \* Expresión relativa significativamente diferente a la observada en los respectivos controles inyectados con PBS.

#### 4.2. Efectos sobre la transcripción de genes relacionados con el IFN en bazo

También determinamos el efecto que producía la administración de VLPs en los niveles de transcripción de genes relacionados con la respuesta de IFN en el bazo. Las VLPs indujeron un incremento significativo de la transcripción de Mx en el bazo en el día 1 post-administración (**Figura 40**). Por el contrario, se observó una reducción significativa en los niveles de transcripción de IFN- $\gamma$  e IFN2, a día 6 y día 3 respectivamente.

## RESULTADOS

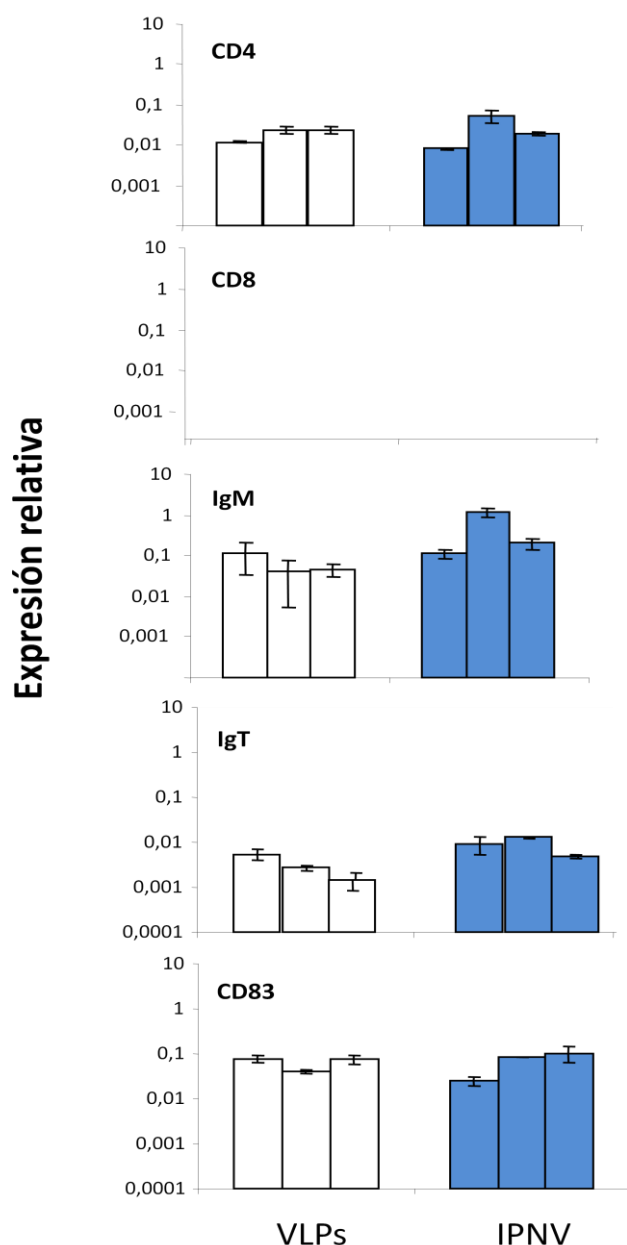


**Figura 40. Expresión de genes relacionados con la respuesta a IFN en el bazo en respuesta a la administración de VLP.** Las VLPs fueron inyectadas intraperitonealmente y la expresión de los genes en el bazo fue determinada mediante PCR a tiempo real a diferentes tiempos post-inyección. Los datos se muestran como la media de la expresión del gen relativa al gen endógeno control EF-1 $\alpha$   $\pm$  desviación estándar (N=5). \* Expresión relativa significativamente diferente a la observada en los respectivos controles inyectados con PBS.

### 4.3. Caracterización de células movilizadas a peritoneo

La inyección intraperitoneal de VLPs frente a distintos antígenos en trucha arcoíris indujo una fuerte movilización leucocitaria hacia el peritoneo, como ya se describió previamente en respuesta a otros antígenos (Kollner *et al.*, 2001) y se ha verificado en nuestros experimentos. Mientras que el número de células detectadas en el peritoneo de las truchas arcoíris sin tratar fue insignificante, el recuento en los peces inyectados con VLPs fue elevado. Para caracterizar mejor la naturaleza de estas células, evaluamos los niveles de

transcripción de varios genes marcadores tales como CD4, CD8, IgM, IgT y CD83. En todos los casos la respuesta observada frente a las VLPs fue similar a aquella observada en respuesta al virus vivo (**Figura 41**). Mientras que la expresión de CD4 fue detectada en estas células, no se detectó CD8, lo que sugería que las células T CD8<sup>+</sup> no son movilizadas hacia el peritoneo. La transcripción de IgM, IgT y CD83 también fue detectada en estas células, revelando que tanto las células B IgM<sup>+</sup> como las IgT<sup>+</sup>, así como las células que asumirían el rol de células dendríticas, también son movilizadas hacia el peritoneo.

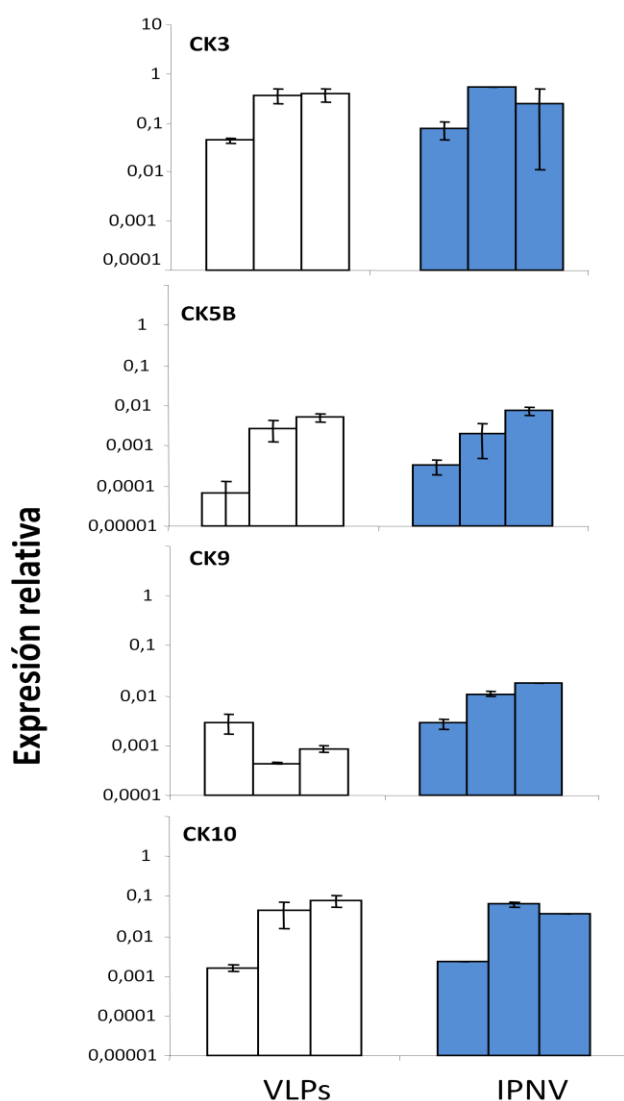


**Figura 41. Expresión de genes codificantes para marcadores de poblaciones leucocitarias en células obtenidas de la cavidad peritoneal de peces inyectados con VLPs o IPNV vivo.** Los peces fueron inyectados intraperitonealmente con VLPs o con IPNV vivo y, después de 24 h, se recogieron con PBS las células que habían migrado a la cavidad intraperitoneal. El ARN se extrajo de estas células para determinar los niveles de transcripción de los genes inmunes. Los datos se expresan como los valores de expresión relativa individuales respecto a EF-1 $\alpha$  obtenidos para tres peces de cada grupo.

## RESULTADOS

### 4.4. Transcripción de quimioquinas de las células movilizadas a peritoneo

Probablemente la movilización de células al peritoneo está mediada a través de la producción de quimioquinas iniciada por las células peritoneales residentes. Debido al reducido número de leucocitos residentes no fue posible analizar la respuesta de quimioquinas en estas células. Así pues, estudiamos los niveles de transcripción de diferentes genes de quimioquinas en las células movilizadas para comprender mejor que quimioquinas estaban implicadas en el proceso. CK3, CK5B, CK9 y CK10 fueron los únicos genes de quimioquinas detectados en estas células, indicando que esas quimioquinas son las implicadas preferentemente en la movilización de las células hacia el peritoneo en respuesta a la infección (**Figura 42**). De nuevo no se observaron diferencias entre los niveles desatados por el virus vivo frente a los desatados por las VLPs.



**Figura 42. Expresión de genes de quimioquinas de células obtenidas de la cavidad peritoneal de peces inyectados con VLPs o IPNV.** Los peces fueron inyectados intraperitonealmente con PBS o IPNV vivo y, después de 24 hs, se recogieron con PBS las células que habían migrado a la cavidad intraperitoneal. Las células se resuspendieron y se extrajo el RNA para la determinación de los genes de quimioquinas transcritos. Los datos se expresan como los valores de expresión relativa individual de las quimioquinas obtenidas para tres peces en cada grupo. No se obtuvieron células de los grupos sin tratar.

#### 4.5. Producción de anticuerpos neutralizantes

Aunque anteriormente ya se había demostrado que las VLPs son capaces de inducir la producción efectiva de anticuerpos (Shivappa *et al.*, 2005), se verificó que esto también era el caso en nuestros experimentos. Como se esperaba, se observaron altos títulos de neutralización en los peces vacunados (**Tabla 4**). Aunque la neutralización se detectó ya a día 21 post-vacunación, los títulos se incrementaron a día 31 post-vacunación.

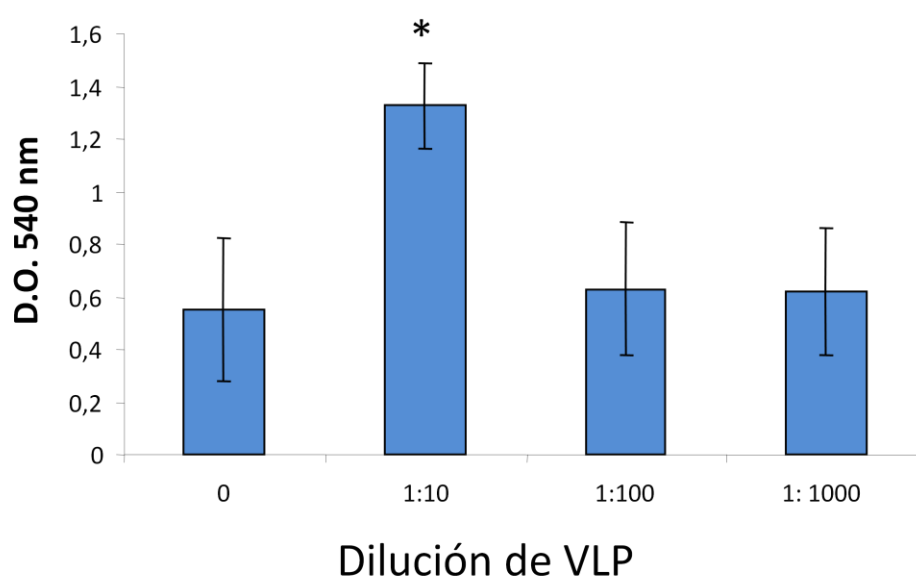
21 días post-vacunación				30 días post-vacunación			
Control		VLPs		Control		VLPs	
C1	20	V1	80	C1	20	V1	80
C2	20	V2	80	C2	20	V2	320
C3	20	V3	80	C3	40	V3	160
		V4	80			V4	160
		V5	160			V5	80
		V6	160			V6	1280
		V7	640			V7	1280
		V8	160			V8	160
		V9	80			V9	80

**Tabla 4. Títulos de neutralización de IPNV obtenidos en los sueros obtenidos de truchas vacunadas con VLPs y los controles inyectados con PBS.** V: truchas vacunadas con VLPs. C: controles inyectados con PBS. Los sueros fueron obtenidos de peces individuales los días 21 y 30 después de la vacunación. El título de cada suero fue determinado como el recíproco de la dilución del suero que reducía la infectividad viral (100 TCID<sub>50</sub>/ml) aproximadamente al 50% comparado con un control negativo.

## RESULTADOS

### 4.6. Proliferación inespecífica

También se evaluó la capacidad de las VLPs de IPNV para inducir directamente la proliferación de linfocitos *in vitro* usando leucocitos sanguíneos de peces sin tratar. La concentración más alta de VLPs evaluada fue capaz de producir una proliferación significativa de leucocitos sanguíneos (**Figura 43**).



**Figura 43. Proliferación inespecífica de los leucocitos en sangre en respuesta a VLPs.** Los leucocitos sanguíneos fueron incubados con distintas diluciones de VLPs a 20°C durante 2 días. En ese momento se añadió NBT y las células fueron incubadas otras 24 h. Transcurridas éstas, la proliferación celular se estimó a través de la absorbancia a 540 nm. Los datos representan la media de la DO a 540 nm obtenida para tres cultivos independientes  $\pm$  desviación estandar. \* Proliferación significativamente diferente a aquella observada en los cultivos control.

## VI. DISCUSIÓN





La acuicultura se ha consolidado como un sector productivo importante, debido al aumento de la población mundial y una pesca extractiva al límite de sus posibilidades. Al igual que en otros sectores productivos animales, el impacto de las enfermedades infecciosas es uno de los principales problemas que debe ser controlado, ya pueden llegar a producirse pérdidas económicas importantes. Dentro de las enfermedades infecciosas los virus son de especial importancia debido a las grandes mortalidades que generalmente provocan, la falta de tratamientos antivirales y la escasez de vacunas eficaces. Esto se traduce en el hecho de que la gran mayoría de enfermedades de declaración obligatoria para la OIE o la UE son de origen vírico. Dentro de ellas, los rhabdovirus engloban al grupo más numeroso de patógenos de peces, incluyendo a VHSV e IHNV, dos virus que provocan unas importantes pérdidas en la producción de salmónidos a nivel mundial. IPNV, de la familia de los birnavirus, también es considerado uno de las principales causas de pérdidas económicas en salmónidos debido en gran medida a su amplia distribución y su gran persistencia.

A pesar de que se pueden encontrar soluciones frente a las infecciones en acuicultura en el campo de nuevos antibióticos, antifúngicos o antivirales, estas estrategias no están bien vistas ni por los acuicultores, ni por los consumidores, ni por las autoridades. Por lo tanto, la prevención de enfermedades por medio de la vacunación es, tanto en base a principios éticos como económicos, el método más apropiado para el control de patógenos.

Aunque las vacunas antibacterianas basadas exclusivamente en evidencias empíricas, generalmente son efectivas para el control de estas infecciones, por lo menos a corto plazo, solamente existen un pequeño número de vacunas antivirales (de dudosa efectividad) y ninguna vacuna antiparasitaria. Frente a esto, un mayor conocimiento del sistema inmune de los peces y como éste reacciona frente a la infección y/o la vacunación, nos podría ayudar a identificar los mecanismos moleculares y las rutas clave en el sistema inmune, que una vacuna eficaz debe activar. En un futuro, ésto nos permitiría seleccionar el antígeno/adyuvante adecuado, el método óptimo de administración o el desarrollo de ensayos que nos permitan evaluar la eficacia de la vacuna sin tener que recurrir al ensayo-error para el diseño de nuevas estrategias vacunales.

En base a estos principios, en esta Tesis Doctoral hemos querido profundizar en los mecanismos inmunológicos que se desatan en la trucha arcoíris, una de las principales especies cultivadas a nivel mundial, en respuesta a distintas estrategias vacunales frente a rhabdovirus (utilizando vacunas ADN) o frente a IPNV (utilizando VLPs). En el caso de las vacunas ADN, hemos querido además, abordar algunos aspectos más prácticos como son el

## DISCUSIÓN

aumento de la efectividad mediante el uso de adyuvantes moleculares o la posible administración oral de estas vacunas.

### **1. Vacunas ADN frente a rabdovirus**

Se ha comprobado que la vacunación con vacunas ADN es la estrategia de prevención más efectiva para el control de las infecciones por rabdovirus en peces (Lorenzen y LaPatra, 2005). Sin embargo, el coste de estas vacunas todavía es elevado en comparación con el coste de los peces a tratar, siendo esta una de las razones por las que estas vacunas no están siendo utilizadas en todo el mundo, y sólo una vacuna frente a IHNV ha sido aprobada para su uso en Canadá (Novartis Aquahealth). El coste podría verse reducido a través de una mayor efectividad que podría estar mediada por la utilización de adyuvantes moleculares. Por otro lado, la posibilidad de administrar de forma masiva la vacuna también reduciría significativamente los costes de vacunación, siendo los métodos de administración óptimos la vacunación oral o por inmersión.

#### **1.1. Aumento de la inmunogenicidad por medio de la incorporación de motivos CpG**

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue aumentar la inmunogenicidad de las vacunas ADN frente a rabdovirus. Los adyuvantes tradicionales tales como las emulsiones de aceites u óxidos de aluminio van acompañados de efectos adversos, los cuales en el caso de la inyección intramuscular podrían ser graves, con el consecuente impacto en el bienestar animal así como en la calidad del producto final, que es precisamente el músculo. Por eso, la utilización de adyuvantes moleculares sería la estrategia más adecuada para las vacunas ADN, y dentro de ellas, la introducción de modificaciones en el propio plásmido sería lo más deseable.

Los motivos CpG son oligodeoxinucleótidos que contienen motivos CpG no-metilados, y que permiten a las células eucariotas detectar el ADN bacteriano a través del receptor de tipo Toll 9 (TLR9). Mientras que la metilación en bacterias es un fenómeno poco frecuente, los vertebrados suelen metilar la mayor parte de sus secuencias CpG en la posición 5' de la citosina, por lo que estos motivos no-metilados se suelen reconocer como señales de alarma para que el organismo desate una respuesta inmune innata, lo que sería un efecto beneficioso en el marco de una vacunación. De esta forma se ha demostrado que los motivos CpG presentes de forma constitutiva en los plásmidos utilizados como vacunas ADN juegan

un papel importante en la inducción de la inmunidad (Chico *et al.*, 2009; Jorgensen *et al.*, 2001a; Lorenzen *et al.*, 2002).

En los peces, otros autores habían demostrado previamente que estos motivos CpG tenían propiedades inmunoestimuladoras, comprobando efectos estimuladores en la proliferación linfocitaria (Carrington *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007), en la producción de diversos factores inmunes (Jorgensen *et al.*, 2001b; Oumouna *et al.*, 2002) o incluso factores antivirales (Jorgensen *et al.*, 2001a; Jorgensen *et al.*, 2001b). Sin embargo, nunca se había comprobado su efecto en conjunción con una vacuna, salvo en un trabajo previo en el que se comprobó que añadiendo motivos CpG inmunoestimulantes para ratón a un plásmido de expresión, la producción de anticuerpos aumentaba en peces (Kanellos *et al.*, 1999). El hecho de poder introducir los motivos CpG adicionales directamente en el esqueleto del plásmido además nos abría la posibilidad de incrementar la eficacia sin aumentar las lesiones.

En este estudio, primero hemos determinado los efectos de la introducción de motivos CpG adicionales en la vacuna mediante los niveles de expresión de algunos genes inmunes que se sabe que se correlacionan con la protección tras la vacunación ADN en peces. En primer lugar, sabemos que la inducción de IFN de tipo I es esencial para la eficacia de las vacunas ADN en peces, ya que varios estudios han demostrado que la transcripción de Mx inducida por IFN de tipo I se correlaciona con la protección conferida (Lorenzen *et al.*, 2009; McLauchlan *et al.*, 2003). Así pues, nosotros estudiamos los niveles de transcripción de Mx en respuesta a diferentes construcciones vacunales, a través del diseño de una PCR a tiempo real que detecta de forma conjunta las tres isoformas de Mx de trucha arcoíris (Cuesta y Tafalla, 2009). En el músculo, la transcripción de Mx se indujo en respuesta a todas las construcciones vacunales al mismo tiempo, aunque la magnitud de la respuesta fue mayor en el caso de la construcción pVHSV-2CpG, permaneciendo además durante más tiempo. En el bazo, sin embargo, las vacunas modificadas con motivos CpGs provocaron una inducción más rápida de Mx, con una magnitud no muy diferente de aquella inducida más tarde por la vacuna pVHSV. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por otros autores en salmón atlántico en el cuál demuestran que los fragmentos CpG sintéticos inducen IFN, llegando incluso a conferir protección innata contra una infección viral mediante inyección *in vivo* (Jorgensen *et al.*, 2001a).

En el caso del IFN de tipo II, sin embargo, la respuesta observada fue muy diferente. En este caso, la introducción de motivos CpG en las vacunas ADN provocó una

## DISCUSIÓN

disminución de los niveles de transcripción del gen IFN- $\gamma$ , en comparación con las desatadas por la vacuna ADN original, excepto en el bazo a día 7, cuando se obtuvo una transcripción significativamente más alta de IFN- $\gamma$  con la vacuna pVHSV-4CpG, en comparación con la vacuna original. Estos resultados parecen estar en contradicción con otros presentados previamente por Carrington y cols. (Carrington *et al.*, 2004) en trucha arcoíris en el que muestran que los CpGs estimulan la proliferación linfocitaria (Carrington *et al.*, 2004), lo cual en un principio parecería correlacionar con la producción de IFN- $\gamma$ . Además hay varios artículos de mamíferos en los cuales se ha demostrado que los CpGs producen IFN- $\gamma$  (Klinman *et al.*, 1999). Sin embargo, cada vez estamos viendo de forma más clara que la respuesta celular en peces no es equivalente del todo a la de los mamíferos, y que la producción de IFN- $\gamma$  y la respuesta celular específica no se correlaciona en peces de una forma tan directa. Además, la identificación de un nuevo gen homólogo al IFN- $\gamma$  de mamíferos ha sido descrito en trucha arcoíris (Purcell *et al.*, 2009) y en otras especies de peces teleósteos (Stolte *et al.*, 2008), siendo hasta el momento desconocida su función, y de nuevo dificultando la atribución de los roles inmunes de cada una de estas citoquinas y su función exacta en la proliferación linfocitaria. En cualquier caso, todavía nos queda mucho trabajo por hacer hasta poder entender completamente la regulación de la proliferación específica en peces, así como el papel que el IFN- $\gamma$  juega en ella.

En el caso de la transcripción de MHC-I, se observó una fuerte variabilidad individual en los niveles de transcripción en el músculo. En el bazo, sin embargo, se observaron fuertes inducciones a día 2 post vacunación con las vacunas modificadas con CpGs aunque no con la vacuna original. Estudios previos en peces demostraron la capacidad inmunomodulatoria de los CpGs en la expresión de los genes MHC-II (Carrington y Secombes, 2006), aunque con grandes diferencias entre leucocitos de orígenes diferentes, ya que mientras los leucocitos del riñón cefálico respondían a los CpGs, los esplenocitos no lo hacían (Iliev *et al.*, 2010). No se había descrito hasta el momento el efecto de los CpGs en la transcripción de MHC-I en peces, pero en base a nuestros resultados parece que estos también se inducen.

Sorprendentemente, hemos detectado que la introducción de motivos CpG en la vacuna disminuía los niveles de transcripción de IL-1 $\beta$  inducidos, con diferencias significativas en los momentos en que la vacuna original provocó su producción, 1 o 14 días después de la vacunación para músculo y bazo respectivamente. La razón por la cual factores

pro-inflamatorios como la IL-1 $\beta$  se inducen de forma tan tardía en respuesta a la vacuna en bazo se desconoce, pero está en correlación con estudios previos en los cuales la IL-1 $\beta$  no se detectó en el bazo hasta día 7 en respuesta a una vacuna ADN para IHNV (Purcell *et al.*, 2004). En ausencia de una vacuna se había demostrado que los ONDs ricos en CpGs inducen directamente IL-1 $\beta$  en peces (Tassakka *et al.*, 2006). Sin embargo un estudio nuevo realizado en salmón demostró que aunque la respuesta de transcripción general fuera mayor en respuesta a CpGs que a LPS, la respuesta transcripcional de IL-1 $\beta$  se indujo fuertemente en respuesta a LPS y no a los CpGs (Iliev *et al.*, 2010). Estas discrepancias nos hacen ver que a pesar de que existan estudios previos acerca de los efectos de los CpGs en distintos modelos y sobre distintas funciones inmunes, cada modelo se comporta de forma muy diferente y por lo tanto sus efectos deben de ser estudiados en cada situación de forma independiente.

Finalmente, y refiriéndonos a la respuesta específica provocada por la vacuna, los efectos más drásticos fueron observados en la producción de anticuerpos neutralizantes, en los cuales las vacunas modificadas con CpGs aumentaron significativamente su intensidad en comparación con la vacuna pVHSV. Este incremento de la capacidad neutralizante se correlaciona con resultados previos obtenidos en otros modelos. Por ejemplo, Liu y cols. (44) demostraron recientemente que un plásmido que contenía un ODN inmunomodulatorio específico junto a una subunidad de una vacuna de *Vibrio harveyi* incrementó la producción de anticuerpos específicos frente a la bacteria. Asimismo, cuando un motivo CpG con capacidad inmunoestimuladora en ratones fue incluido en un plásmido de expresión y posteriormente inyectado en trucha arcoíris, la respuesta de anticuerpos a este antígeno también aumentó de forma significativa (Kanellos *et al.*, 1999). Sin embargo, en otro estudio en el que los CpGs se administraron en paralelo al plásmido se consiguió aumentar la proliferación celular pero no respuesta de anticuerpos (Carrington *et al.*, 2004). Por todo esto parece que la incorporación de los motivos CpGs dentro del plásmido vacunal, no sólo es una estrategia más práctica sino también más adecuada para obtener una respuesta más elevada de anticuerpos en las vacunas ADN.

En conclusión, la introducción de motivos CpG adicionales en una vacuna ADN frente a VHSV modifica fuertemente la respuesta inmune desatada. Resumiendo, los plásmidos modificados con motivos CpG provocan un aumento general de la transcripción de Mx y MHC-I y una disminución de la transcripción de IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ . No es fácil deducir qué efectos tienen estas regulaciones inmunes en la protección conferida, pero es previsible

## DISCUSIÓN

que un incremento de la producción de anticuerpos neutralizantes junto con una mayor cantidad de Mx, debería ir correlacionada con un incremento de la protección, ya que la inmunización pasiva frente a VHSV es capaz de conferir protección (Hershberger *et al.*, 2011; LaPatra *et al.*, 1994) y sabemos que la protección también correlaciona con niveles de Mx (Boudinot *et al.*, 1998; Lorenzen *et al.*, 2002).

### 1.2. Infiltración celular en la zona de expresión del antígeno

Otro de los aspectos que hemos querido analizar en esta Tesis Doctoral es el tipo de células que se infiltran en el músculo en respuesta a la inyección intramuscular de las vacunas ADN frente a rabdovirus, analizando tanto los tipos celulares atraídos como las quimioquinas a través de las cuales se realiza este reclutamiento a la zona de expresión del antígeno. Comprender como se desata esta primera exposición al antígeno, nos permitirá comprender los primeros pasos que determinan la respuesta inmune innata que desata la vacunación, y que además sienta las bases de la respuesta inmune específica que se desencadena posteriormente.

Además, conocer estos mecanismos por los cuales se reconoce el antígeno y se desata esta respuesta inmune, nos permitiría seleccionar moléculas que sumándose a este proceso pudieran funcionar como adyuvantes adecuados que aumentaran el reclutamiento de células inmunes y por lo tanto la efectividad de las vacunas ADN. De otra forma, hasta el momento, y a pesar de que en mamíferos las quimioquinas son uno de los adyuvantes moleculares más comúnmente utilizados en vacunas ADN a nivel experimental (Ahlers *et al.*, 2003; Eo *et al.*, 2001; Lusso, 2002), los estudios que se han realizado combinando algunas quimioquinas o citoquinas con vacunas ADN no han sido capaces de aumentar su efectividad a pesar de que estas moléculas por sí solas tenían una gran capacidad inmunoestimuladora (Montero *et al.*, 2009b). Es posible que hasta que incluyamos como adyuvantes, quimioquinas que ya de por sí son capaces de reclutar células inmunes hasta el músculo, no seamos capaces de observar los efectos deseados.

Por eso, en este trabajo, en primer lugar analizamos los niveles de transcripción de un grupo amplio de quimioquinas en respuesta a la vacunación ADN en el músculo. Para ello, realizamos los estudios en paralelo con la vacuna ADN frente a VHSV y la obtenida frente a IHNV, con el fin de corroborar nuestros resultados y establecer si podrían observarse diferencias en respuesta a distintos antígenos. En general, la respuesta observada en respuesta a las dos vacunas fue similar aunque sí se observaron algunas diferencias que en principio

podrían justificar que células de animales vacunados sean capaces de diferenciar entre la vacuna ADN frente a VHSV y la de IHN, migrando específicamente a la zona de pinchazo de la vacuna con la cual se vacunó (Utke *et al.*, 2008). Es posible que el mecanismo por el cual una célula primada distingue entre ambas vacunas venga así determinado por la combinación de quimioquinas que ambas vacunas inducen, aunque es necesario realizar un mayor número de estudios para realmente concluir esto.

Como era de esperar, los resultados observados entre individuos fueron muy variables, debido probablemente en gran medida a la dificultad de localizar de forma precisa la zona de pinchazo, y por ligeras diferencias en la cantidad de músculo sin antígeno incluida en cada una de las muestras. Debido a estos factores, decidimos fijar como valores significativamente distintos aquellos para los que la  $p$  fuese menor de 0,1. De esta forma, vimos que las vacunas ADN inducían la transcripción de algunas quimioquinas en comparación con los niveles de transcripción observados en respuesta al plásmido vacío. Estas quimioquinas inducidas fueron CK5B, CK6, CK10 y CK11, únicamente frente a VHSV. CK12 fue inducida tanto frente a VHSV como a IHN. CXCL10 (también denominada como  $\gamma$ IP) e IL-8 fueron inducidas frente a IHN. Estos resultados nos muestran que de forma general las quimioquinas del tipo CC juegan un mayor papel en el reclutamiento de células inmunes al sitio de inflamación que las CXC. En mamíferos, se sabe que las quimioquinas CC atraen células mononucleares, monocitos/macrófagos y linfocitos, mientras que las quimioquinas CXC pueden ser atrayentes para neutrófilos y algunos subgrupos de linfocitos (Clark-Lewis *et al.*, 1993; Clark-Lewis *et al.*, 1991). Sin embargo, mientras no conozcamos cuáles son las células atraídas por cada una de estas quimioquinas de trucha específicamente, así como los efectos que la señalización produce en las células reclutadas, no podemos comprender del todo el significado biológico de estas inducciones. En el caso de la CK6, esta quimioquina podría estar atrayendo macrófagos, ya que se ha comprobado que es capaz de atraer macrófagos maduros de la línea celular establecida RTS11 (Montero *et al.*, 2008). En el caso de la CK12, sin embargo, sabemos que esta quimioquina recluta linfocitos T y B residentes a las zonas de inflamación, y aunque parece jugar un papel importante en llevar estas células hasta las mucosas (Montero *et al.*, 2011), parece que también en el músculo juega un papel similar. De hecho, a pesar de que no era previsible encontrar una infiltración de linfocitos, ya que en mamíferos la gran mayoría de células que se infiltran en el músculo en respuesta a una vacuna ADN son células mieloides (monocitos y leucocitos polimorfonucleares) (Marino *et al.*, 2011), en nuestros estudios hemos detectado una infiltración masiva de linfocitos especialmente de linfocitos B. Estos



## DISCUSIÓN

linfocitos tanto  $\text{IgM}^+$  como  $\text{IgT}^+$  se han detectado tanto por PCR a tiempo real como por inmunohistoquímica y constituyen la gran mayoría de células infiltradas, a pesar de que también se ha detectado un ligero aumento de los niveles de transcripción de CD4 por PCR (no existe actualmente disponible un anticuerpo anti-CD4 de trucha). Es posible que esto se deba a la falta de nódulos linfáticos en peces, en los que en mamíferos se realizaría la presentación de antígeno, mientras que en este caso, la presentación se realizaría directamente en la zona de expresión del antígeno en el músculo. Sin embargo, es necesario realizar todavía una gran cantidad de estudios para determinar si efectivamente es esto lo que está ocurriendo. En cualquier caso, es posible que aquí resida en gran medida el éxito de las vacunas ADN en peces, mucho más efectivas que las vacunas ADN de mamíferos (Shedlock y Weiner, 2000).

En conclusión, hemos determinado que la inyección intramuscular de una vacuna ADN frente a rabdovirus provoca un aumento de los niveles de transcripción de CK5B, CK6, CK10 y CK11, únicamente frente a VHSV, y CXCL10 e IL-8 solamente frente a IHNV. Los niveles de transcripción de CK12 aumentaron en respuesta a ambas vacunas inyectadas intramuscularmente. La inducción de estas quimioquinas se ha traducido en una infiltración masiva constituida principalmente por linfocitos B tanto  $\text{IgM}^+$  como  $\text{IgT}^+$ . Es posible por lo tanto que únicamente aumentando la infiltración de este tipo de células seamos capaces de aumentar la efectividad de las vacunas ADN en peces.

### 1.3. Administración oral de las vacunas ADN

En esta Tesis Doctoral se han abordado varios aspectos de la vacunación ADN, estudiando tanto la posibilidad de aumento de efectividad mediante el uso de adyuvantes como el estudio de la respuesta inmune desatada por estas vacunas. Sin embargo, uno de los aspectos prácticos más importantes del uso de estas vacunas es buscar métodos de administración que permitan su utilización en condiciones de campo. Hasta el momento, la administración intramuscular de vacunas ADN frente a rabdovirus como el VHSV e IHNV ha demostrado ser altamente efectiva (Kurath, 2005; Lorenzen *et al.*, 2002). Sin embargo, este método de administración limita enormemente el número de individuos que se pueden vacunar en un día, así como el tamaño mínimo de los peces a vacunar. Por este motivo, es necesario investigar nuevos métodos de administración más adecuados a las necesidades actuales que permitan la vacunación en masa. La vacunación oral es un método muy recomendable ya que permite vacunar un gran número de individuos con costes relativamente bajos, mediante un procedimiento fácil y sin causar estrés a los peces (Bowden,

2003b; Shao, 2001; Vandenberg, 2004). En un estudio de Adelman y col. se evaluó la respuesta inmune y la protección conferida por una frente a VHSV en el que se recubrió el virus liofilizado con polietileno de glicol, para su administración vía oral. La vacuna se expresó en el intestino de los animales vacunados y la protección conferida resultó ser de aproximadamente el 75% (Adelman *et al.*, 2008). Hasta el momento, sin embargo, esto no se ha conseguido para las vacunas ADN frente a rabdovirus. Además, se sabe que en peces, al igual que en vertebrados superiores, este tipo de vacunación estimula el sistema inmune de la mucosa intestinal (Lin, 2000; Vandenberg, 2004), lo cual puede ser deseable según qué tipo de infecciones. Por todo esto, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue explorar la posibilidad de administrar las vacunas ADN frente a VHSV e IHNV de forma oral analizando la absorción de la vacuna en el intestino, la expresión de genes inmunes a nivel local y la relación entre la respuesta inmune local y sistémica que se producía.

En nuestro estudio, para proteger la vacuna del ataque del pH ácido del tracto digestivo, ésta se encapsuló en microesferas de alginatos, siguiendo un protocolo previamente descrito para administrar oralmente una vacuna ADN frente a IPNV con resultados positivos (de las Heras *et al.*, 2010). En primer lugar analizamos la absorción de la vacuna, estudiando por PCR a tiempo real, la transcripción del plásmido en las distintas partes del intestino. De esta forma comprobamos que la vacuna se expresa más a medida que avanzamos hacia regiones más posteriores del intestino, siendo máxima en el intestino posterior, donde también se detectó la G de VHSV mediante inmunohistoquímica.

Una vez habíamos comprobado que mediante la encapsulación en alginatos la vacuna es capaz de llegar a todos los segmentos del intestino, y expresarse adecuadamente, procedimos a analizar la expresión de diferentes genes inmunes en la parte posterior del intestino, ya que es precisamente en esta zona donde existe un mayor número de células inmunes asociadas, y donde la respuesta inmune local suele ser mayor (Doggett y Harris, 1989; Rombout *et al.*, 2011). Elegimos una selección de genes inmunes que *a priori* podían jugar un papel importante en la respuesta inmune local tales como Mx (como marcador de inducción de IFN de tipo I), IgM, IgT, CK12 y CCR7.

Lo primero que se observó es que, en la mayoría de las genes analizados, la respuesta se produce principalmente a días tardíos post-vacunación, en relación a lo que se observa en respuesta a las vacunas ADN inyectadas intramuscularmente (Anderson *et al.*, 1996b; Lorenzen *et al.*, 1998b; Lorenzen *et al.*, 2002). Esto puede ser consecuencia de que la vacuna ADN administrada oralmente se encuentra recubierta de alginatos y por lo tanto requiere su

## DISCUSIÓN

liberación para comenzar a expresarse adecuadamente. Por otro lado, también es posible que la respuesta inmune a nivel de las mucosas esté ralentizada respecto a la respuesta inmune sistémica, como consecuencia de los fenómenos de tolerancia inmune frente a la flora intestinal. Un ejemplo de esta respuesta inmune tardía de menor intensidad es la expresión de Mx, que sólo aumento en el grupo vacunado con la mayor dosis frente a los demás grupos a día 21 post-vacunación, mientras que generalmente se encuentra inducida a día 7-14 post-vacunación con altos niveles en respuesta a la vacuna intramuscular (McLauchlan *et al.*, 2003). En el caso de IgM también, a pesar de que en algunos individuos se detecta una ligera expresión en respuesta a la vacuna a día 3, no es hasta el día 21 cuando está inducción de los niveles de IgM en los peces vacunados es significativa.

En este estudio, hemos estudiado tanto los niveles de expresión de IgM, como los de IgT, ya que esta inmunoglobulina específica de peces, no descubierta hasta el año 2005 (Hansen *et al.*, 2005), parece que juega un papel importante en la inmunidad en mucosas, que sería equivalente a la de IgA en mamíferos (Zhang *et al.*, 2010). Estos estudios previos determinaron que cuando se infectan truchas con un parásito intestinal, se produce una gran movilización de células IgT<sup>+</sup>, que llevan incluso a desplazar a las células IgM<sup>+</sup> que se encontraban residentes en la mucosa. En nuestro trabajo, sin embargo, también los niveles relativos de transcripción (respecto al EF-1 $\alpha$ ) de IgT son superiores a los de IgM, pero en el caso de IgT las diferencias entre grupos no es tan marcada con la de IgM en la que los niveles observados en los peces vacunados son significativamente mayores a los observados en los peces vacunados con el plásmido vacío, mientras que en el caso de IgT estas diferencias entre grupos no están tan marcadas. Por lo tanto, parece que lo que moviliza la vacuna hacia la mucosa intestinal son principalmente células IgM<sup>+</sup>. A pesar de esta respuesta local de anticuerpos, este tipo de vacunación no produjo en nuestro caso una producción de anticuerpos sistémica en la sangre de los animales vacunados, ya que no se detectaron niveles significativos de anticuerpos IgM en sangre. A pesar de que en muchos casos la respuesta de anticuerpos no se correlaciona del todo con la protección conferida por las vacunas ADN intramusculares (McLauchlan *et al.*, 2003), es muy posible que esta haya sido la principal razón de la falta de protección observada en el desafío posterior.

Otro de los genes inmunes que estudiamos fue la quimioquina CK12, ya que se han estudios previos realizados en nuestro grupo demostraron que está implicada en el reclutamiento de linfocitos inactivados tanto B como T a mucosas (Montero *et al.*, 2011). Como ocurrió con los otros genes, la transcripción de esta quimioquina se detectó a tiempos

tardíos y sobre todo en respuesta a la vacuna con la dosis más elevada del plásmido. Por último, se evaluó la transcripción de CCR7, un receptor de quimioquinas que en mamíferos está implicado en la movilización de linfocitos T y de células dendríticas a la mucosa intestinal en la que se producen las quimioquinas CCL19 y CCL21 en respuesta a una infección local (Forster *et al.*, 2008; Weninger y von Andrian, 2003). Nuestro grupo, ha identificado recientemente el gen de CCR7 en trucha arcoíris (datos no publicados), y por lo tanto, debido a su relevancia en la respuesta inmune de mucosas, hemos incluido su estudio en esta Tesis Doctoral. En este caso, y a diferencia de los otros genes estudiados mostró una expresión más temprana (día 7 post-vacunación), ya que fue en este momento cuando los niveles de expresión en los individuos vacunados fue significativamente mayor a la de los otros grupos.

A pesar de haber comprobado que la vacuna se expresa correctamente, y que produce una respuesta inmune local, aunque no sistémica, este método de administración de la vacuna ADN no fue capaz de conferir protección, cuando se comparó con la protección observada en repuesta a la inyección intramuscular que alcanzo en nuestro experimento el 100% de protección conferida, tal como se había comprobado anteriormente (Corbeil *et al.*, 2000a; Lorenzen *et al.*, 1998b). Los motivos por la falta de protección observada pueden ser de distinta índole. Es posible que a pesar de que detectamos la vacuna y una respuesta inmune local, los niveles de absorción de la vacuna no hayan sido los suficientes, y por lo tanto deberíamos aumentar la dosis de vacuna, que siempre debe de ser mayor en vacunas orales que en intramusculares debido a la posible pérdida de vacuna por una menor absorción intestinal. Sin embargo, otra posible explicación a tener en cuenta es que este tipo de vacunación sólo es efectiva cuando, en un posterior desafío, el patógeno tiene un claro tropismo por la mucosa intestinal, ya que si lo que provoca el virus en cuestión es una enfermedad sistémica que afecta principalmente a riñón y bazo (órganos linfoides), como en el caso de VHSV (Chilmonczyk y Oui, 1988), el tener una barrera intestinal primada frente al patógeno, no nos es de gran ayuda, dado además que los rabdovirus como VHSV e IHNV entran en el hospedador por la base de las aletas (Harmache *et al.*, 2006).

La vacunación oral es una de los métodos más recomendables de la vacunación masiva de peces, aunque es posible que estemos intentando establecer esta ruta para patógenos en los que ni la vía de entrada ni su tropismo nos permitirían hacerlo. Sin embargo, si unimos una práctica administración oral a la alta eficacia de las vacunas ADN frente a rabdovirus, nos encontraríamos con una vacuna de alto valor comercial y de gran

## DISCUSIÓN

importancia para el sector acuícola. Por lo tanto, merece la pena continuar explorando las posibilidades de este tipo de vacunación, bien aumentando la dosis, bien introduciendo algún tipo de adyuvante que prime una respuesta sistémica o bien haciendo que el plásmido se distribuya de forma sistémica una vez atravesada la mucosa intestinal. En cualquier caso, también parece imprescindible continuar profundizando en los mecanismos inmunes de los peces frente a virus, también en lo relativo a la respuesta inmune de mucosas, algo claramente olvidado de momento, ya que apenas se conocen los mecanismos de reclutamiento de células inmunes a las mucosas ni su funcionalidad.

### 2. VLPs frente a IPNV

Por último, en esta Tesis Doctoral, quisimos estudiar la respuesta inmune que se desata frente a otro tipo de vacunación viral, las cápsidas vacías o VLPs. Estudios previos realizados en nuestro grupo habían determinado la respuesta inmune desatada mediante una vacuna ADN frente a IPNV (Cuesta *et al.*, 2010). Esta vacuna se basaba en la expresión de la poliproteína viral VP1 en un plásmido de expresión eucariota. Una vez expresada la poliproteína en el interior de la célula transfectada, por medio de la proteasa VP4, se liberan las proteínas virales VP2 y VP3. Una vez expresadas estas dos proteínas se formarían VLPs de forma espontánea, las cuales parecían liberarse al exterior de las células (Cuesta *et al.*, 2010). En estas condiciones, la respuesta inmune desatada por esta vacuna ADN difería bastante de la observada en respuesta a las vacunas ADN frente a rhabdovirus, con un mecanismo de acción completamente distinto en el que la glicoproteína viral se expresa en la superficie de la célula transfectada (Lorenzen *et al.*, 2005). De esta forma, con IPNV teníamos un modelo viral en el cual poder comparar los efectos de una vacuna ADN con los inducidos por la partícula viral directamente en forma de VLPs administradas directamente. Además en el caso de virus no envueltos como IPNV, las VLPs parecen una estrategia vacunal adecuada, sobre la cual no se habían realizado apenas estudios acerca de la respuesta inmune desatada.

En este trabajo, nos centramos en primer lugar en estudiar como la administración intraperitoneal de las VLPs de IPNV afectaba a la transcripción de una selección de genes de quimioquinas que incluían como en otros casos todos los genes de quimioquinas CXC identificados hasta la fecha en trucha arcoíris y una selección de quimioquinas CC basada en la clasificación de quimioquinas CC de peces en siete grandes grupos hecha por Peatman y Liu (Peatman and Liu, 2007). De esta forma, hemos establecido que la administración de VLPs aumenta la transcripción de CK3, CK10 y CXCD y disminuye la transcripción de

CK5B, CK6 y CK9, siendo esta una respuesta distinta a la observada en respuesta al virus vivo, tal como se había demostrado anteriormente. En el bazo, la infección con IPNV vivo sólo aumentaba significativamente CK6 y disminuía CK3 (Montero *et al.*, 2009a). Aunque siempre es difícil identificar los verdaderos ortólogos de moléculas inmunes identificadas en peces, esta tarea es aún más difícil en el caso de las quimioquinas de tipo CC. Los recientes eventos de duplicación sufridos en el genoma de algunas especies de peces teleósteos, así como el hecho de que las quimioquinas se encuentran entre las proteínas que más rápido evolucionan debido a las distintas experiencias infecciosas, hacen que sea muy difícil establecer verdaderos ortólogos entre quimioquinas CC de mamíferos y peces. Por lo tanto, aun no podemos explicar las consecuencias de estas diferencias en la inducción de quimioquinas en respuesta a virus vivo o partículas vacías, aunque podría ser posible que las diferencias observadas en la respuesta limitada de quimioquinas inducidas por IPNV y la amplia respuesta provocada por las VLPs fueran consecuencia de alguna interferencia viral con la producción de estas moléculas.

Para entender mejor la respuesta inmune que se activa en el peritoneo en respuesta a la inyección de las VLPs, también determinamos los niveles de expresión de varios genes marcadores de linfocitos para establecer que tipos células migran al peritoneo en respuesta a la inyección, así como niveles de transcripción de quimioquinas en las poblaciones de linfocitos observados en el peritoneo después de la activación para poder intuir el mecanismo a través del cual las células son atraídas hasta esta zona. En este caso, no se observaron diferencias entre las respuestas desatadas por las VLPs o por el virus vivo. Nuestros resultados mostraron que las son células T CD4<sup>+</sup> y linfocitos B IgM<sup>+</sup> e IgT<sup>+</sup> los que migran al peritoneo en respuesta a las partículas de IPNV, independientemente de que sean infecciosas o no. Sin embargo no se detectan niveles de CD8 en el peritoneo lo que nos indica que las células T CD8<sup>+</sup> no se movilizan hasta el peritoneo. También detectamos la transcripción de CD83, un marcador para las células dendríticas activadas o diferenciadas (Lechmann *et al.*, 2002a; Lechmann *et al.*, 2002b; Prechtel y Steinkasserer, 2007), aunque no sabemos todavía si este marcador se está expresando en una línea celular específica equivalente a una célula dendrítica o presentadora de antígeno profesional. O bien algún otro tipo celular está jugando el papel de célula dendrítica. En trucha arcoíris, CD83 se ha detectado mayormente en los tejidos linfoides tales como el timo, pronefros y el bazo y se ha encontrado ausente en intestino, hígado, músculo o corazón (Ohta *et al.*, 2004), pero su expresión no fue estudiada en tipos celulares específicos. Sin embargo la implicación de las células CD83<sup>+</sup> en la respuesta antiviral, ya se había demostrado previamente ya que los

## DISCUSIÓN

niveles de CD83 aumentan en respuesta IHNV en el bazo, el intestino y el pronefros (Ohta *et al.*, 2004)). Por otro lado, en mamíferos, los niveles de CD83 aumentan en células dendríticas en respuesta a la estimulación con VLPs del virus Ébola (Bosio *et al.*, 2004), donde además se ha establecido que la proteína de fusión une monocitos de sangre periférica y una subpoblación de linfocitos CD8<sup>+</sup> (Scholler *et al.*, 2001). En nuestro caso, no detectamos células CD8<sup>+</sup> entre los leucocitos peritoneales, pero aunque no detectamos la presencia de monocitos en el peritoneo debido a la falta de un marcador exclusivo para monocitos identificado en peces, varios estudios han demostrado previamente que los monocitos están entre las células que migran preferentemente al peritoneo en respuesta a estímulos locales (Cuesta *et al.*, 2007; Kollner *et al.*, 2001). En cualquier caso, las células peritoneales parecen ser reclutadas a través de la acción exclusiva de un pequeño número de quimioquinas, ya que sólo CK3, CK5B, CK9 y CK10 se transcriben en el peritoneo en estas condiciones, no pareciendo que las quimioquinas CXC jueguen un rol importante en este proceso. En cualquier caso, si estas quimioquinas son también responsables del reclutamiento al peritoneo en respuesta a estímulos no virales queda por determinar. Aunque tal como indicamos anteriormente, se desconocen todavía gran parte de las funciones inmunes de estas quimioquinas, vale la pena señalar que CK5B, que parece jugar un papel importante en la respuesta a VLPs tanto en el bazo como en el peritoneo, está estrechamente relacionada con CCL5 o RANTES de mamíferos (Peatman y Liu, 2007), para la cual se ha demostrado una inducción directa en células B en respuesta a VLPs (Zhang *et al.*, 2009).

Por último, volviendo a la posible utilización de esas VLPs como estrategia de vacunación contra IPNV, también hemos estudiado funciones relacionadas con una eficiente respuesta inmune. De esta forma, hemos establecido que estas VLPs además de desencadenar la producción de anticuerpos neutralizantes específicos, probablemente debido a su conformación, también son capaces de inducir la proliferación inespecífica de linfocitos, tal como se había demostrado previamente para otras VLPs en modelos de mamíferos en los cuales su capacidad de unir y activar directamente células B y no células T ha sido demostrada (Zhang *et al.*, 2009). En cuanto a las respuestas del IFN, que en peces se han correlacionado a veces con la protección antiviral (McLauchlan *et al.*, 2003), las VLPs aumentaron la transcripción de Mx en tiempos muy tempranos, para volver a niveles constitutivos. Esto se parece a la respuesta inducida por la vacuna DNA que codifica la proteína VP2 del virus (de Las Heras *et al.*, 2009; de las Heras *et al.*, 2010), pero es muy diferente a las respuestas observadas para vacunas ADN que codifican el segmento A de IPNV las cuáles no inducen la respuesta Mx hasta el día 7 post-vacunación (Cuesta *et al.*,

2010). A pesar de que el IFN- $\gamma$  fue producido en respuesta a VLPs en diferentes modelos virales de mamíferos (Sominskaya *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2004), en nuestro experimento, nosotros no vimos una regulación de la transcripción del IFN- $\gamma$  en respuesta a las VLPs, como ocurría con la vacuna ADN de IPNV que codifica el segmento A (Cuesta *et al.*, 2010). A pesar de esto, no se puede excluir que se esté desencadenando una respuesta Th1, ya que hay aún muchos aspectos de la funcionalidad del IFN- $\gamma$  en peces que requieren un mayor estudio. En cualquier caso, si la estrategia de la administración de las VLPs directamente es mejor o no que la inyección del segmento A en una vacuna ADN que producirá más tarde VLPs endógenas queda por investigar más a fondo. La posibilidad de administrar las VLPs a través de baño constituirá un gran avance y los estudios en otros modelos virales han apuntado a una protección más eficaz cuando las VLPs se administran directamente en el huésped (Jin *et al.*, 2007).

En conclusión, hemos establecido que además de producir anticuerpos neutralizantes, la vacunación con VLPs de IPNV induce en trucha arcoíris la proliferación de linfocitos inespecíficos, junto con una inducción del IFN de tipo I y una movilización de linfocitos CD4<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, IgT<sup>+</sup> and C83<sup>+</sup> al peritoneo. Además, hemos caracterizado la respuesta de quimioquinas tanto como en el bazo como en el peritoneo. En conjunto, nuestros resultados apuntan a las VLPs como excelentes candidatos para vacunas antivirales en los peces.





## VII. CONCLUSIONES



1. La introducción de varias copias de un fragmento rico en motivos CpG en una vacuna ADN frente a VHSV aumenta de forma significativa la inmunogenicidad de la vacuna, observándose un aumento de la producción de anticuerpos neutralizantes y de la producción de interferón de tipo I.
2. La inyección intramuscular de vacunas ADN provoca en el músculo la inducción de un patrón de quimioquinas con algunas diferencias en función del antígeno.. De forma general las quimioquinas del tipo CC juegan un mayor papel en el reclutamiento de células inmunes al sitio de inflamación que las CXC.
3. La inyección intramuscular de la vacuna pVHSV frente a VHSV provoca una infiltración masiva de linfocitos, especialmente de linfocitos B, tanto IgM<sup>+</sup> como IgT<sup>+</sup>, así como CD4<sup>+</sup>.
4. La encapsulación de la vacuna ADN frente a VHSV mediante alginatos permite una administración oral de la vacuna, produciéndose la expresión adecuada del antígeno en la mucosa intestinal.
5. La administración oral de una vacuna ADN frente a VHSV mediante alginatos produce una respuesta inmune tardía en la región posterior del intestino caracterizada por la inducción de Mx, IgM, IgT, CK12 y CCR7.
6. A pesar de la correcta expresión del antígeno y la respuesta inmune inducida, la administración oral de la vacuna ADN frente a VHSV no fue capaz de proporcionar protección frente a un desafío con VHSV virulento por baño. Pese a la expresión de anticuerpos a nivel local no se detectaron anticuerpos a nivel sistémico (IgM en el suero de los animales vacunados).
7. La administración intraperitoneal de VLPs frente a IPNV inducen un patrón de transcripción de quimioquinas en bazo significativamente distinto al observado frente a virus vivo, además de la transcripción de Mx en este órgano.
8. La administración intraperitoneal de VLPs frente a IPNV induce la producción de anticuerpos neutralizantes frente al virus junto con una proliferación inespecífica de linfocitos.
9. Finalmente, la inyección tanto de virus vivo como de VLPs en el peritoneo provoca la movilización de leucocitos CD4<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, IgT<sup>+</sup> y CD83<sup>+</sup> a través de la producción de quimioquinas tales como CK3, CK5B, CK9 y CK10.



## VIII. BIBLIOGRAFÍA



- Adelmann M., Kollner B., Bergmann S. M., Fischer U., Lange B., Weitschies W., Enzmann P. J. and Fichtner D. (2008) Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia. *Vaccine* **26**, 837-44.
- Ahlers J. D., Belyakov I. M. and Berzofsky J. A. (2003) Cytokine, chemokine, and costimulatory molecule modulation to enhance efficacy of HIV vaccines. *Current Molecular Medicine* **3**, 285-301.
- Alonso M., Johson M., Simon B. and Leong J. A. (2003) A fish specific expression vector containing the interferon regulatory factor 1A(IRF1A) promoter for genetic immunization of fish. *Vaccine* **21**, 1591-1600.
- Allnutt F. C., Bowers R. M., Rowe C. G., Vakharia V. N., LaPatra S. E. and Dhar A. K. (2007) Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast. *Vaccine* **25**, 4880-8.
- Amend D. and Chambers V. (1970) Morphology of certain viruses of salmonid fishes *In vivo* studies of infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal Fish Research Board Canada* **27**, 1385-1388.
- Amend D. F. and Smith L. (1974) Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): early changes in blood and aspects of the immune response after injection of IHN virus. *Journal Fish Research Board Canada* **31**, 1371-1378.
- Amin A. B., Trasti, J. (1988) Endomyocarditis in Atlantic salmon in Norwegian seafarms—a case report. *Bulletin of the European Association Fish Pathologists* **8**, 70-71.
- Anderson E. D., Mourich D. V., Fahrenkrug S. C., LaPatra S. C., Shepherd J. and Leong J. C. (1996a) Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **5**, 114-122.
- Anderson E. D., Mourich D. V. and Leong J. C. (1996b) Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **5**, 105-113.
- Bacon K., Baggiolini M., Broxmeyer H., Horuk R., Lindley I., Mantovani A., Maysushima K., Murphy P., Nomiyama H., Oppenheim J., Rot A., Schall T., Tsang M., Thorpe R., Van Damme J., Wadhwa M., Yoshie O., Zlotnik A. and Zoon K. (2002) Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research: IJIM* **22**, 1067-8.
- Basurco B. and Coll J. M. (1989) Spanish isolates and reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus shown similar protein size patterns. *Bulletin of the European Association Fish Pathologists* **9**, 92-95.
- Basurco B. and Coll J. M. (1992) *In vitro* studies and *in vivo* immunisation with the first viral haemorrhagic septicaemia viruses isolated in Spain compared to international reference serotypes. *Research Veterinary Science* **53**, 93-97.



## BIBLIOGRAFÍA

- Bearzotti M., Delmas B., Lamoureux A., Loustau A. M., Chilmonczyk S. and Bremont M. (1999) Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *Journal of Virology* **73**, 7703-7709.
- Benmansour A. and de Kinkelin P. (1997) Live fish vaccines: history and perspectives. *Developments in Biological Standardization* **90**, 279-89.
- Bernard D., Six A., Rigottier-Gois L., Messiaen S., Chilmonczyk S., Quillet E., Boudinot P. and Benmansour A. (2006) Phenotypic and functional similarity of gut intraepithelial and systemic T cells in a teleost fish. *Journal of Immunology* **176**, 3942-9.
- Biering E., Villoing S., Sommerset I. and Christie K. E. (2005) Update on viral vaccines for fish. *Developments in Biological Standardizations (Basel)* **121**, 97-113.
- Bly J. E. and Clem L. W. (1991) Temperature-mediated processes in teleost immunosuppression induced by *in vivo* low temperature in channel catfish. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **28**, 365-377.
- Bootland L. M., Leong, J.C. (1999) Infectious Haematopoietic Necrosis Virus. *Fish Diseases and Disorders*.
- Bosio C. M., Moore B. D., Warfield K. L., Ruthel G., Mohamadzadeh M., Aman M. J. and Bavari S. (2004) Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells. *Virology* **326**, 280-7.
- Boudinot P., Blanco M., de Kinkelin P. and Benmansour A. (1998) Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* **249**, 297-306.
- Bowden T., Adamson, K., Maclachlan, P., Pert, C., Bricknell, I. (2003a) Long term study of antibody response and injection-site effects of oil adjuvants in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish and Shellfish Immunology* **14**, 363-369.
- Bowden T. B., I; Ellis, A. E. (2003b) Fish Vaccination, an overview, p. 5-20. Industry report IntraFish.
- Bridle A. R., Butler R. and Nowak B. F. (2003) Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides increase resistance against amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **26**, 367-71.
- Carrington A. C., Collet B., Holland J. W. and Secombes C. J. (2004) CpG oligodeoxynucleotides stimulate immune cell proliferation but not specific antibody production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **101**, 211-22.
- Carrington A. C. and Secombes C. J. (2006) A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **112**, 87-101.

- Clark-Lewis I., Dewald B., Geiser T., Moser B. and Baggiolini M. (1993) Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3574-7.
- Clark-Lewis I., Schumacher C., Baggiolini M. and Moser B. (1991) Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH<sub>2</sub>-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities. *Journal of Chemical Biology* **266**, 23128-34.
- Coll J. M. (1991) Las enfermedades producidas por virus. *Hojas divulgadoras* **13**, 16.
- Corbeil S., Kurath G. and LaPatra S. E. (2000a) Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish and Shellfish Immunology* **10**, 711-723.
- Corbeil S., LaPatra S. E., Anderson E. D., Jones J., Vincent B., Hsu Y. L. and Kurath G. (1999) Evaluation of the protective immunogenicity of the N, P, M, NV and G proteins of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* using DNA vaccines. *Diseases of Aquatic Organisms* **39**, 29-36.
- Corbeil S., LaPatra S. E., Anderson E. D. and Kurath G. (2000b) Nanogram quantities of a DNA vaccine protect rainbow trout fry against heterologous strains of infectious hematopoietic necrosis virus. *Vaccine* **18**, 2817-2824.
- Cuesta A., Chaves-Pozo E., de Las Heras A. I., Saint-Jean S. R., Perez-Prieto S. and Tafalla C. (2010) An active DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) with a different mode of action than fish rhabdovirus DNA vaccines. *Vaccine* **28**, 3291-300.
- Cuesta A., Rodriguez A., Salinas I., Meseguer J. and Esteban M. A. (2007) Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead seabream after intraperitoneal injection of whole yeast cells. *Fish and Shellfish Immunology* **22**, 242-51.
- Cuesta A. and Tafalla C. (2009) Transcription of immune genes upon challenge with viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in DNA vaccinated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine* **27**, 280-9.
- Chen Y., Xiang L. X. and Shao J. Z. (2007) Construction of a recombinant plasmid containing multi-copy CpG motifs and its effects on the innate immune responses of aquatic animals. *Fish and Shellfish Immunology* **23**, 589-600.
- Chico V., Ortega-Villaizan M., Falco A., Tafalla C., Perez L., Coll J. M. and Estepa A. (2009) The immunogenicity of viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV) DNA vaccines can depend on plasmid regulatory sequences. *Vaccine* **27**, 1938-48.
- Chilmonczyk S. and Oui E. (1988) The effects of gamma irradiation on the lymphoid organs of rainbow trout and subsequent susceptibility to fish pathogens. *Veterinary immunology and immunopathology* **18**, 173-180.

## BIBLIOGRAFÍA

- Dale O. B., Orpetveit I., Lyngstad T. M., Kahns S., Skall H. F., Olesen N. J. and Dannevig B. H. (2009) Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Diseases of aquatic organisms* **85**, 93-103.
- Dalmo R. A., Ingebrigtsen K. and Bogwald J. (1997) Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases* **20**, 241-273.
- de Las Heras A. I., Perez Prieto S. I. and Rodriguez Saint-Jean S. (2009) *In vitro* and *in vivo* immune responses induced by a DNA vaccine encoding the VP2 gene of the infectious pancreatic necrosis virus. *Fish and Shellfish Immunology* **22**, 120-129
- de las Heras A. I., Rodriguez Saint-Jean S. and Perez-Prieto S. I. (2010) Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish and Shellfish Immunology* **28**, 562-70.
- DeLuca D., Wilson M. and Warr G. W. (1983a) Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *European Journal of Immunology* **13**, 546-551.
- DeLuca D., Wilson M. and Warr G. W. (1983b) Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *European Journal of Immunology* **13**, 546-51.
- Demmers K. J., Derecka K. and Flint A. (2001) Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* **121**, 41-9.
- Deng X. L., Wang X., Wei D. P., Zhang P., Cai M. Y., Bi J. H. and Hu L. L. (2005) [Infiltration of DCs and CD4+ T cells in muscle after DNA immunization]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **36**, 519-21, 565.
- Doggett T. A. and Harris J. E. (1989) Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* **33**, 747-756.
- Douglas S. E., Patrzykat A., Pytyck J. and Gallant J. W. (2003) Identification, structure and differential expression of novel pleurocidins clustered on the genome of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *European Journal of Biochemistry* **47**, 3720-30.
- Eisenbarth S. C., Colegio O. R., O'Connor W., Sutterwala F. S. and Flavell R. A. (2008) Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* **453**, 1122-6.
- Ellis A. E. (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and comparative immunology* **25**, 827-39.
- Eo S. K., Pack C., Kumaraguru U. and Rouse B. T. (2001) Optimisation of DNA vaccines for the prophylaxis and modulation of herpes simplex virus infections. *Expert opinion on biological therapy* **1**, 213-225.

- Evans J. J., Klesius P. H. and Shoemaker C. A. (2004) Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration. *Vaccine* **22**, 3769-73.
- FAO. (2010) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010, p. 219p., Roma, FAO.
- Ferguson H. W., Poppe, T., Speare, D.J. (1990) Cardiomyopathy in farmed Norwegian salmon. *Diseases of aquatic organisms* **8**, 225-231.
- Fernandez-Alonso M., Rocha A. and Coll J. M. (2001) DNA vaccination by immersion and ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine* **19**, 3067-3075.
- Fischer U., Utke K., Ototake M., Dijkstra J. M. and Kollner B. (2003) Adaptive cell-mediated cytotoxicity against allogeneic targets by CD8-positive lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and comparative immunology* **27**, 323-37.
- Forster R., Davalos-Misslitz A. C. and Rot A. (2008) CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature reviews. Immunology* **8**, 362-71.
- Frantsi C. and Savan M. (1971) Infectious pancreatic necrosis virus--temperature and age factors in mortality. *Wildlife disease* **7**, 249-55.
- Gillund F., Kjolberg K. A., von Krauss M. K. and Myhr A. I. (2008) Do uncertainty analyses reveal uncertainties? Using the introduction of DNA vaccines to aquaculture as a case. *The Science of the Total Environment* **407**, 185-96.
- Graham S. S. C. (1988) The production of macrophage-activating factor from rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Immunology* **65**, 293-297.
- Gudding R., Lillehaugh A. and Evensen O. (1999) Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **72**, 203-212.
- Hansen J. D., Landis E. D. and Phillips R. B. (2005) Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6919-24.
- Harmache A., Leberre M., Droineau S., Giovannini M. and Bremont M. (2006) Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for *Novirhabdovirus*. *Journal of Virology* **103**, 3655-9.
- Harun N. O., Costa M. M., Secombes C. J. and Wang T. Sequencing of a second interleukin-10 gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and comparative investigation of the expression and modulation of the paralogues *in vitro* and *in vivo*. *Fish and Shellfish Immunology* **31**, 107-17.
- Haugland O., Mikalsen A. B., Nilsen P., Lindmo K., Thu B. J., Eliassen T. M., Roos N., Rode M. and Evensen O. (2011) Cardiomyopathy syndrome of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the *Totiviridae* family. *Journal of Virology* **85**, 5275-86.

## BIBLIOGRAFÍA

- Heppell J. and Davis H. L. (2000) Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews* **43**, 29-43.
- Hershberger P. K., Gregg J. L., Grady C. A., LaPatra S. E. and Winton J. R. (2011) Passive immunization of Pacific herring against viral hemorrhagic septicemia. *Journal of Aquatic Animal Health* **23**, 140-7.
- Huising M. O., Guichelaar T., Hoek C., Verburg-vanKemenade B. M., Flik G., Savelkoul H. F. J. and Rombout J. H. W. M. (2003) Increased efficacy of immersion vaccination in fish with hyperosmotic pretreatment. *Vaccine* **21**, 4178-4193.
- Iliev D. B., Jorgensen S. M., Rode M., Krasnov A., Harneshaug I. and Jorgensen J. B. (2010) CpG-induced secretion of MHCIIbeta and exosomes from salmon (*Salmo salar*) APCs. *Developmental and Comparative Immunology* **34**, 29-41.
- Jang S. I., Hardie L. J. and Secombes C. J. (1995) Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants. *Journal of Leukocyte Biology* **57**, 943-947.
- Jensen M. H. (1965) Research on the virus of Egtved disease. *Ann N Y Acad Sci* **126**, 422-6.
- Jin H., Xiao W., Xiao C., Yu Y., Kang Y., Du X., Wei X. and Wang B. (2007) Protective immune responses against foot-and-mouth disease virus by vaccination with a DNA vaccine expressing virus-like particles. *Viral Immunology* **20**, 429-40.
- Jorgensen J. B., Johansen A., Stenersen B. and Sommer A. I. (2001a) CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 313-321.
- Jorgensen J. B., Johansen L. H., Steiro K. and Johansen A. (2003) CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Virol* **77**, 11471-9.
- Jorgensen J. B., Zou J., Johansen A. and Secombes C. J. (2001b) Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1 beta and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism. *Fish and Shellfish Immunology* **11**, 673-682.
- Kanellos T., Sylvester I. D., D'Mello F., Howard C. R., Mackie A., Dixon P. F., Chang K. C., Ramstad A., Midtlyng P. J. and Russell P. H. (2006) DNA vaccination can protect *Cyprinus carpio* against spring viraemia of carp virus. *Vaccine* **24**, 4927-33.
- Kanellos T. S., Sylvester I. D., Butler V. L., Ambali A. G., Partidos C. D., Hamblin A. S. and Russell P. H. (1999) Mammalian granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and some CpG motifs have an effect on the immunogenicity of DNA and subunit vaccines in fish. *Immunology* **96**, 507-10.
- Kibenge F. S., Munir K., Kibenge M. J., Joseph T. and Moneke E. (2004) Infectious salmon anemia virus: causative agent, pathogenesis and immunity. *Animal Health Research Reviews* **5**, 65-78.

- Kim J. J., Yang J. S., Dentchev T., Dang K. and Weiner D. B. (2000) Chemokine gene adjuvants can modulate immune responses induced by DNA vaccines. *J Interferon. Cytokine Research* **20**, 487-498.
- Klesius P., Shoemaker, A., Evans, J. . (2000) Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **188**, 237-246.
- Klesius P. H., Evans J. J. and Shoemaker C. A. (2004) Warmwater fish vaccinology in catfish production. *Animal Health Research Reviews* **5**, 305-11.
- Klinman D. M., Barnhart K. M. and Conover J. (1999) CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine* **17**, 19-25.
- Kollner B., Blohm U., Kotterba G. and Fischer U. (2001) A monoclonal antibody recognising a surface marker on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocytes. *Fish and Shellfish Immunology* **11**, 127-42.
- Krieg A. M. (2000) The role of CpG motifs in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* **12**, 35-43.
- Krieg A. M., Yi A. K., Schorr J. and Davis H. L. (1998) The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends in Microbiology* **6**, 23-7.
- Kurath G. (2005) Overview of recent DNA vaccine development for fish. *Developments in Biologicals* **121**, 201-13.
- Laing K. J., Zou J. J., Purcell M. K., Phillips R., Secombes C. J. and Hansen J. D. (2006) Evolution of the CD4 family: teleost fish possess two divergent forms of CD4 in addition to lymphocyte activation gene-3. *Journal of Immunology* **177**, 3939-51.
- Laing K. J., Zou J. J., Wang T., Bols N., Hirono I., Aoki T. and Secombes C. J. (2002) Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology* **26**, 433-44.
- LaPatra S. E. (1996) The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. *Annual Review of Fish Diseases* **6**, 15-28.
- LaPatra S. E., Corbeil S., Jones G. R., Shewmaker W. D., Lorenzen N., Anderson E. D. and Kurath G. (2001) Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine* **19**, 4011-4019.
- LaPatra S. E., Lauda K. A., Jones G. R., Walker S. C. and Shewmaker W. D. (1994) Development of passive immunotherapy for control of infectious hematopoietic necrosis. *Diseases of Aquatic Organisms* **20**, 1-6.
- Lechmann M., Berchtold S., Hauber J. and Steinkasserer A. (2002a) CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends in Immunology* **23**, 273-5.

## BIBLIOGRAFÍA

- Lechmann M., Zinser E., Golka A. and Steinkasserer A. (2002b) Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *International Archives of Allergy and Immunology* **129**, 113-8.
- Lee C. H., Jeong H. D., Chung J. K., Lee H. H. and Kim K. H. (2003) CpG motif in synthetic ODN primes respiratory burst of olive flounder *Paralichthys olivaceus* phagocytes and enhances protection against *Edwardsiella tarda*. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**, 43-8.
- Leong J. C., Anderson E., Bootland L. M., Chiou P. W., Johnson M., Kim C., Mourich D. and Trobridge G. (1997) Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Development in Biological Standards* **90**, 267-77.
- Li J., Barreda D. R., Zhang Y. A., Boshra H., Gelman A. E., Lapatra S., Tort L. and Sunyer J. O. (2006) B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology* **7**, 1116-24.
- Lin J. H., Yu C. C., Lin C. C. and Yang H. L. (2005) An oral delivery system for recombinant subunit vaccine to fish. *Developments in Biologicals (Basel)* **121**, 175-80.
- Lin S., Davison, G., Secombes, C., Ellis, A. (2000) Use of a emulsion lipid emulsion carrier for the immunization of dab (*Limanda limanda*) by bath and oral routes: an assessment of systemic and mucosal antibody responses. *Aquaculture* **181**, 11-24.
- Lorenzen E., Einer-Jensen K., Rasmussen J. S., Kjaer T. E., Collet B., Secombes C. J. and Lorenzen N. (2009) The protective mechanisms induced by a fish rhabdovirus DNA vaccine depend on temperature. *Vaccine* **27**, 3870-80.
- Lorenzen E., Lorenzen N., Einer-Jensen K., Brudeseth B. and Evensen O. (2005) Time course study of in situ expression of antigens following DNA-vaccination against VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) fry. *Fish and Shellfish Immunology* **19**, 27-41.
- Lorenzen N., Cupit P. M., Einer-Jensen K., Lorenzen E., Ahrens P., Secombes C. J. and Cunningham C. (2000) Immunoprophylaxis in fish by injection of mouse antibody genes. *Nature Biotechnology* **18**, 1177-1180.
- Lorenzen N., Olesen N. J. and Jorgensen P. E. V. (1988) Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Diseases of Aquatic Organisms* **4**, 35-42.
- Lorenzen N. and LaPatra S. E. (2005) DNA vaccines for aquacultured fish. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **24**, 201-213.
- Lorenzen N., Lorenzen E., Einer-Jensen K., Heppell J., Wu T. and Davis H. (1998b) Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish and Shellfish Immunology* **8**, 261-270.
- Lorenzen N., Lorenzen E., Einer-Jensen K. and LaPatra S. E. (2002) DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune system response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology* **12**, 439-453.

- Lorenzen N. and Olesen N. J. (1997) Immunization with viral antigens: viral haemorrhagic septicemia. *Developmental Biological Standards* **90**, 201-209.
- Lorenzen N., Olesen N. J. and Jorgensen P. E. V. (1993a) Antibody response in rainbow trout to VHS virus proteins. *Fish and Shellfish Immunology* **3**, 461-473.
- Lorenzen N., Olesen N. J., Jorgensen P. E. V., Etzerodt M., Holtet T. L. and Thogersen H. C. (1993b) Molecular-Cloning and Expression in Escherichia-Coli of the Glycoprotein Gene of Vhs Virus, and Immunization of Rainbow-Trout with the Recombinant Protein. *Journal of General Virology* **74**, 623-630.
- Lorenzo G., Estepa A. and Coll J. M. (1996) Fast neutralization/immunoperoxidase assay for viral haemorrhagic septicemia with anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *Journal of Virological Methods* **58**, 1-6.
- Lusso P. (2002) HIV and chemokines: implications for therapy and vaccine. *Vaccine* **20**, 1964-1967.
- MacKenzie S., Planas J. V. and Goetz F. W. (2003) LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and *in vitro* differentiated macrophages. *Developmental and Comparative Immunology* **27**, 393-400.
- Magyar G. and Dobos P. (1994) Evidence for the detection of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein and the 17-kDa polypeptide in infected cells and of the NS protease in purified virus. *Virology* **204**, 580-9.
- Marino M., Scuderi F., Provenzano C. and Bartoccioni E. (2011) Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity. *Gene Therapy* **18**, 109-16.
- Marsden M. J., Vaughan L. M., Foster T. J. and Secombes C. J. (1996) A live (delta aroA) *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis preferentially stimulates T-cell responses relative to B-cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infection and Immunity* **64**, 3863-9.
- McAllister P. E. and Schill W. B. (1986) Immunoblot assay: a rapid and sensitive method for identification of salmonid fish viruses. *Journal of Wildlife Diseases* **22**, 468-474.
- McLauchlan P. E., Collet B., Ingerslev E., Secombes C. J., Lorenzen N. and Ellis A. E. (2003) DNA vaccination against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout: size, dose, route of injection and duration of protection-early protection correlates with Mx expression. *Fish and Shellfish Immunology* **15**, 39-50.
- McLoughlin M. F. and Graham D. A. (2007) Alphavirus infections in salmonids--a review. *Journal of Fish Diseases* **30**, 511-31.
- Medzhitov R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology* **1**, 135-45.
- Midtlyng P. J. (1997) Vaccinated fish welfare: protection versus side-effects. *Developments in biological standardization* **90**, 371-9.



## BIBLIOGRAFÍA

- Midtlyng P. J., Reitan L. J. and Speilberg L. (1996) Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish and Shellfish Immunology* **6**, 335-350.
- Mikalsen A. B., Torgersen J., Alestrom P., Hellemann A. L., Koppang E. O. and Rimstad E. (2004) Protection of atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms* **60**, 11-20.
- Miller N. W., Bly J. E., Van Ginkel F., Ellsaesser C. F. and Clem L. W. (1987) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. *Developmental and Comparative Immunology* **11**, 739-747.
- Mjaaland S., Rimstad E., Falk K. and Dannevig B. H. (1997) Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost. *Journal of Virology* **71**, 7681-6.
- Montero J., Coll J., Sevilla N., Cuesta A., Bols N. C. and Tafalla C. (2008) Interleukin 8 and CK-6 chemokines specifically attract rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS11 monocyte-macrophage cells and have variable effects on their immune functions. *Developmental and Comparative Immunology* **32**, 1374-84.
- Montero J., Chaves-Pozo E., Cuesta A. and Tafalla C. (2009a) Chemokine transcription in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is differently modulated in response to viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) or infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish and Shellfish Immunology* **27**, 661-9.
- Montero J., Chaves-Pozo E., Cuesta A. and Tafalla C. (2009b) Immune effects observed after the injection of plasmids coding for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CK5B, CK6 and CK7A chemokines demonstrate their immunomodulatory capacity and reveal CK6 as a major interferon inducer. *Developmental and Comparative Immunology* **33**, 1137-45.
- Montero J., Ordas M. C., Alejo A., Gonzalez-Torres L., Sevilla N. and Tafalla C. (2011) CK12, a rainbow trout chemokine with lymphocyte chemo-attractant capacity associated to mucosal tissues. *Molecular Immunology* **48**, 1102-13.
- Moore L. J., Somamoto T., Lie K. K., Dijkstra J. M. and Hordvik I. (2005) Characterisation of salmon and trout CD8alpha and CD8beta. *Molecular Immunology* **42**, 1225-34.
- Mori K., Nakai T., Muroga K., Arimoto M., Mushiake K. and Furusawa I. (1992) Properties of a new virus belonging to nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology* **187**, 368-71.
- Morzunov S. P., Winton J. R. and Nichol S. T. (1995) The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Research* **38**, 175-192.
- Mulcahy D., Pascho R. and Jenes C. K. (1984) Comparison of invitro growth characteristics of ten isolates of infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal of General Virology* **65**, 2199-2207.

- Nakanishi T., Kiryu I. and Ototake M. (2002) Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument. *Vaccine* **20**, 3764-9.
- Navot N., Kimmel E. and Avtalion R. R. (2004) Enhancement of antigen uptake and antibody production in goldfish (*Carassius auratus*) following bath immunization and ultrasound treatment. *Vaccine* **22**, 2660-6.
- Nicholson B. L. and P.Caswell. (1982) Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of Clinical Microbiology* **16**, 469-472.
- Nishizawa T., Iida H., Takano R., Isshiki T., Nakajima K. and Muroga K. (2002) Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Diseases of Aquatic Organisms* **48**, 143-148.
- Nomiyama H., Hieshima K., Osada N., Kato-Unoki Y., Otsuka-Ono K., Takegawa S., Izawa T., Yoshizawa A., Kikuchi Y., Tanase S., Miura R., Kusuda J., Nakao M. and Yoshie O. (2008) Extensive expansion and diversification of the chemokine gene family in zebrafish: identification of a novel chemokine subfamily CX. *BMC Genomics* **9**, 222.
- Nylund A., Plarre H., Karlsen M., Fridell F., Ottem K. F., Bratland A. and Saether P. A. (2007) Transmission of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in farmed populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Archives Virology* **152**, 151-79.
- Ohta Y., Landis E., Boulay T., Phillips R. B., Collet B., Secombes C. J., Flajnik M. F. and Hansen J. D. (2004) Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish. *Journal of Immunol* **173**, 4553-60.
- Ortega-Villaizan M., Chico V., Falco A., Perez L., Coll J. M. and Estepa A. (2009) The rainbow trout TLR9 gene and its role in the immune responses elicited by a plasmid encoding the glycoprotein G of the viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Molecular Immunology* **46**, 1710-7.
- Ortega-Villaizan M., Chico V., Martinez-Lopez A., Falco A., Perez L., Coll J. M. and Estepa A. (2011) *In vitro* analysis of the factors contributing to the antiviral state induced by a plasmid encoding the viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein G in transfected trout cells. *Vaccine* **29**, 737-43.
- Oumouna M., Jaso-Friedmann L. and Evans D. L. (2002) Activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) with synthetic oligodeoxynucleotides and bacterial genomic DNA: Binding, specificity and identification of unique immunostimulatory motifs. *Developmental and Comparative Immunology* **26**, 257-269.
- Ozaki A., Sakamoto T., Khoo S., Nakamura K., Coimbra M. R., Akutsu T. and Okamoto N. (2001) Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Genetics and Genomics* **265**, 23-31.

## BIBLIOGRAFÍA

- Pasnik D. J., Evans J. J., Panangala V. S., Klesius P. H., Shelby R. A. and Shoemaker C. A. (2005) Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. *Journal of Fish Diseases* **28**, 205-12.
- Peatman E. and Liu Z. (2007) Evolution of CC chemokines in teleost fish: a case study in gene duplication and implications for immune diversity. *Immunogenetics* **59**, 613-23.
- Plarre H., Devold M., Snow M. and Nylund A. (2005) Prevalence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in wild salmonids in western Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* **66**, 71-9.
- Prechtel A. T. and Steinkasserer A. (2007) CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Archives of Dermatological Research* **299**, 59-69.
- Purcell M. K., Kurath G., Garver K. A., Herwig R. P. and Winton J. R. (2004) Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish and Shellfish Immunology* **17**, 447-462.
- Purcell M. K., Nichols K. M., Winton J. R., Kurath G., Thorgaard G. H., Wheeler P., Hansen J. D., Herwig R. P. and Park L. K. (2006) Comprehensive gene expression profiling following DNA vaccination of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Immunology* **43**, 2089-106.
- Purcell M.K., Laing K. J., Woodson J. C., Thorgaard G. H. and Hansen J. D. (2009) Characterization of the interferon genes in homozygous rainbow trout reveals two novel genes, alternate splicing and differential regulation of duplicated genes. *Fish and Shellfish Immunology* **26**, 293-304.
- Raja-Halli M., Vehmas T. K., Rimaila-Parnanen E., Sainmaa S., Skall H. F., Olesen N. J. and Tapiovaara H. (2006) Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) outbreaks in Finnish rainbow trout farms. *Diseases of Aquatic Organisms* **72**, 201-11.
- Ramanathan V. D., Badenoch-Jones P. and Turk J. L. (1979) Complement activation by aluminium and zirconium compounds. *Immunology* **37**, 881-8.
- Reed L. J. and Muench A. (1938) A simple method of estimating fifty per cent end points. *American Journal of Epidemiology* **27**, 493-497.
- Reno P. W. (1999) Infectious pancreatic necrosis virus and associated aquatic birnaviruses. In: *Fish Diseases and Disorders Vol. 3: viral, bacterial and fungal infections*. Ed. P.T. Woo and D.W. Bruno, 1-55.
- Rhodes L. D., Rathbone C. K., Corbett S. C., Harrell L. W. and Strom M. S. (2004) Efficacy of cellular vaccines and genetic adjuvants against bacterial kidney disease in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Fish and Shellfish Immunology* **16**, 461-474.
- Roberts R. J. and Pearson M. D. (2005) Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **28**, 383-90.

- Rocha A., Fernandez-Alonso M., Mas V., Perez L., Estepa A. and Coll J. M. (2002) Antibody response to a fragment epitope of the protein G of VHS rhabdovirus in immunized trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **86**, 89-99.
- Rocha A., Ruiz S., Tafalla C. and Coll J. M. (2004) Conformation and fusion defective mutants in the hypothetical phospholipid-binding and fusion peptides of the protein G of viral haemorrhagic septicemia salmonid rhabdovirus. *Journal of Virology* **78**, 9115-9122.
- Rodrigues C. M., Martins-Filho O. A., Vaz N. M. and Carvalho C. R. (2006) Systemic effects of oral tolerance on inflammation: mobilization of lymphocytes and bone marrow eosinopoiesis. *Immunology* **117**, 517-25.
- Rodríguez S., Vilas, M.P., Pérez, S.I. (1994) Prevalence of infectious pancreatic necrosis virus on salmonid fish farms in Spain. *Journal of Aquatic Animal Health* **6**, 138-43.
- Rodriguez Saint-Jean S., Borrego J. J. and Perez-Prieto S. I. (2003) Infectious pancreatic necrosis virus: biology, pathogenesis, and diagnostic methods. *Advances in Virus Research* **62**, 113-65.
- Rodriguez Saint-Jean S., Perez S. and Vilas M. P. (1993) Flow cytometric analysis of infectious pancreatic necrosis virus attachment to fish sperm. *Diseases of Aquatic Organisms* **15**, 153-156.
- Romalde J. L., Luzardo-Álvarez, A., Ravelo, C., Toranzo, A.E., Blanco-Méndez, J. (2004) Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture* **236**, 119-129.
- Rombout J. H., Abelli L., Picchietti S., Scapigliati G. and Kiron V. (2011) Teleost intestinal immunology. *Fish and Shellfish Immunology* **31**, 616-26.
- Salonius K., Simard N., Harland R. and Ulmer J. B. (2007) The road to licensure of a DNA vaccine. *Current Opinion Investigational Drugs* **8**, 635-41.
- Sanchez E., Coll J. and Tafalla C. (2007) Expression of inducible CC chemokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to a viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) DNA vaccine and interleukin 8. *Developmental and Comparative Immunology* **31**, 916-26.
- Schijns V. E. (2001) Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Critical Reviews in Immunology* **21**, 75-85.
- Schlegel R., Sue T. T., Willingham M. C. and Pastan I. (1983) Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: Is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* **32**, 639-646.
- Schlottfeldt H. J., Ahne W., Vestergaard-Jorgensen P. E. and Glende W. (1991) Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*)-A natural outbreak. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* **11**, 105-107.

## BIBLIOGRAFÍA

- Scholler N., Hayden-Ledbetter M., Hellstrom K. E., Hellstrom I. and Ledbetter J. A. (2001) CD83 is an I-type lectin adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells. *Journal of Immunology* **166**, 3865-72.
- Schuetze H., Egbert M. and Mettenleiter. (1999) Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus genes* **19**, 59-65.
- Schutze H., Enzmann P. J., Mundt E. and Mettenleiter T. C. (1996) Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus. *The Journal of General Virology* **77 ( Pt 6)**, 1259-63.
- Schutze H., Mundt E. and Mettenleiter T. C. (1999) Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* **19**, 59-65.
- Secombes C. J., Van Groningen J. J. M. and Egberts E. (1983) Separation of lymphocyte subpopulations in carp *Cyprinus carpio* L. by monoclonal antibodies: immunohistochemical studies. *Immunology* **48**, 165-175.
- Secombes C., Zou J., Daniels G., Cunningham C., Koussounadis A. and Kemp G. (1998) Rainbow trout cytokine and cytokine receptor genes. *Immunology Reviews* **166**, 333-40.
- Secombes C. J., Wang T., Hong S., Peddie S., Crampe M., Laing K. J., Cunningham C. and Zou J. (2001) Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 713-23.
- Shao Z. J. (2001) Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities. *Advances Drug Delivery Reviews* **50**, 229-43.
- Shedlock D. J. and Weiner D. B. (2000) DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal Leukocyte Biology* **68**, 793-806.
- Shirota H., Petrenko L., Hong C. and Klinman D. M. (2007) Potential of transfected muscle cells to contribute to DNA vaccine immunogenicity. *Journal of Immunology* **179**, 329-36.
- Shivappa R. B., McAllister P. E., Edwards G. H., Santi N., Evensen O. and Vakharia V. N. (2005) Development of a subunit vaccine for infectious pancreatic necrosis virus using a baculovirus insect/larvae system. *Developments in Biologicals* **121**, 165-74.
- Sin J. I., Kim J. J., Pachuk C., Satishchandran C. and Weiner D. B. (2000) DNA vaccines encoding interleukin-8 and RANTES enhance antigen-specific Th1-type CD4<sup>+</sup> T-cell-mediated protective immunity against herpes simplex virus type 2 *in vivo*. *Journal of Virology* **74**, 11173-11180.
- Skjaeveland I., Iliev D. B., Zou J., Jorgensen T. and Jorgensen J. B. (2008) A TLR9 homolog that is up-regulated by IFN-gamma in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental and Comparative Immunology* **32**, 603-7.
- Smail D. A., Bain N., Bruno D. W., King J. A., Thompson F., Pendrey D. J., Morrice S. and Cunningham C. O. (2006) Infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts in the Shetland Isles, Scotland: virus identification,

- histopathology, immunohistochemistry and genetic comparison with Scottish mainland isolates. *Journal of Fish Diseases* **29**, 31-41.
- Sominskaya I., Skrastina D., Dislers A., Vasiljev D., Mihailova M., Ose V., Dreilina D. and Pumpens P. (2010) Construction and immunological evaluation of multivalent hepatitis B virus (HBV) core virus-like particles carrying HBV and HCV epitopes. *Clinical and Vaccine Immunology* **17**, 1027-33.
- Stolte E. H., Savelkoul H. F., Wiegertjes G., Flik G. and Lidy Verburg-van Kemenade B. M. (2008) Differential expression of two interferon-gamma genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology* **32**, 1467-81.
- Tassakka A. C., Savan R., Watanuki H. and Sakai M. (2006) The *in vitro* effects of CpG oligodeoxynucleotides on the expression of cytokine genes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) head kidney cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **110**, 79-85.
- Thorud K. E. D. H. O. (1988) Infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **8**, 109-111.
- Tian J., Sun X., Chen X., Yu J., Qu L. and Wang L. (2008a) The formulation and immunisation of oral poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules containing a plasmid vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *International Immunopharmacology* **8**, 900-8.
- Tian J. Y., Sun X. Q. and Chen X. G. (2008b) Formation and oral administration of alginate microspheres loaded with pDNA coding for lymphocystis disease virus (LCDV) to Japanese flounder. *Fish and Shellfish Immunology* **24**, 592-9.
- Tonheim T. C., Bogwald J. and Dalmo R. A. (2008) What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology* **25**, 1-18.
- Tucker C., Endo M., Hirono I. and Aoki T. (2000) Assessment of DNA vaccine potential for juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, through the introduction of reporter genes by particle bombardment and histopathology. *Vaccine* **19**, 801-9.
- Utke K., Kock H., Schuetze H., Bergmann S. M., Lorenzen N., Einer-Jensen K., Kollner B., Dalmo R. A., Vesely T., Ototake M. and Fischer U. (2008) Cell-mediated immune responses in rainbow trout after DNA immunization against the viral hemorrhagic septicemia virus. *Developmental and Comparative Immunology* **32**, 239-52.
- Vandenberg G. W. (2004) Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? *Animal Health Research Reviews* **5**, 301-4.
- Weninger W. and von Andrian U. H. (2003) Chemokine regulation of naive T cell traffic in health and disease. *Seminars in Immunology* **15**, 257-70.
- White R. G., Coons A. H. and Connolly J. M. (1955) Studies on antibody production. III. The alum granuloma. *Journal of Experimental Medicine* **102**, 73-82.

## BIBLIOGRAFÍA

- Wolf F. and Quimby M. C. (1962) Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science* **135**, 1065-1066.
- Wolf K. (1988a) Infectious hematopoietic necrosis. *Fish viruses and fish viral diseases*. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Wolf K. (1988b) Infectious pancreatic necrosis. *Fish viruses and fish viral diseases*. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Wong G., Kaattari S. L. and Christensen J. M. (1992) Effectiveness of an oral enteric coated vibrio vaccine for use in salmonid fish. *Immunological Investigations* **21**, 353-64.
- Yoshiura Y., Kiryu I., Fujiwara A., Suetake H., Suzuki Y., Nakanishi T. and Ototake M. (2003) Identification and characterization of Fugu orthologues of mammalian interleukin-12 subunits. *Immunogenetics* **55**, 296-306.
- Zhang R., Li M., Chen C. and Yao Q. (2004) SHIV virus-like particles bind and activate human dendritic cells. *Vaccine* **23**, 139-47.
- Zhang S., Cubas R., Li M., Chen C. and Yao Q. (2009) Virus-like particle vaccine activates conventional B2 cells and promotes B cell differentiation to IgG2a producing plasma cells. *Molecular Immunology* **46**, 1988-2001.
- Zhang Y. A., Salinas I., Li J., Parra D., Bjork S., Xu Z., LaPatra S. E., Bartholomew J. and Sunyer J. O. (2010) IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature Immunology* **11**, 827-35.
- Zhou Y.-C., Huang H., Wang J., Zhang B. and Su Y.-Q. (2002a) Vaccination of the grouper, *Epinephalus awoara*, against vibriosis using the ultrasonic technique. *Aquaculture* **203**, 229-238.
- Zhou Y. C., Wang J., Zhang B. and Su Y. Q. (2002b) Ultrasonic immunization of sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel), with a mixed vaccine against *Vibrio alginolyticus* and *V. anguillarum*. *Journal of Fish Diseases* **25**, 325-331.
- Zou J., Carrington A., Collet B., Dijkstra J. M., Yoshiura Y., Bols N. and Secombes C. (2005) Identification and bioactivities of IFN-gamma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *Journal of Immunology* **175**, 2484-94.

## **IX. ANEXO**





## TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS

### 1. Publicaciones

**S. Martínez-Alonso**, A. Martínez-López, A. Estepa, A. Cuesta, C. Tafalla. (2011) The introduction of multi-copy CpG motifs into an antiviral DNA vaccine strongly up-regulates its immunogenicity in fish. *Vaccine* 29. 1289–1296

**S. Martínez-Alonso**, V.N. Vakharia, S.R. Saint-Jean, S. Pérez-Prieto, C. Tafalla. (2012) Immune responses elicited in rainbow trout through the administration of infectious pancreatic necrosis virus-like particles. *Developmental and Comparative Immunology* 36. 378–384

### 2. Comunicaciones a congresos

THE INTRODUCTION OF MULTI-COPY CpG MOTIFS INTO ANTIVIRAL DNA VACCINES STRONGLY UP-REGULATES INTERFERON INDUCTION. **S. Martínez-Alonso**, M.C. Ordás, A. Martínez-López, A.E. Estepa, C. Tafalla. 9<sup>th</sup> International Congress on the Biology of Fish. Barcelona, 5-7 Julio 2010.

RAINBOW TROUT IMMUNE RESPONSE TO INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS LIKE PARTICLES (VLPs) ADMINISTRATION. **S. Martínez-Alonso**, V.N. Vakharia, S.R. Saint-Jean, S. Pérez-Prieto and C. Tafalla. 15<sup>th</sup> International Conference on Diseases of Fish and Shellfish organizado por la EAFP en Split (Croacia), 12-16 Septiembre 2011.